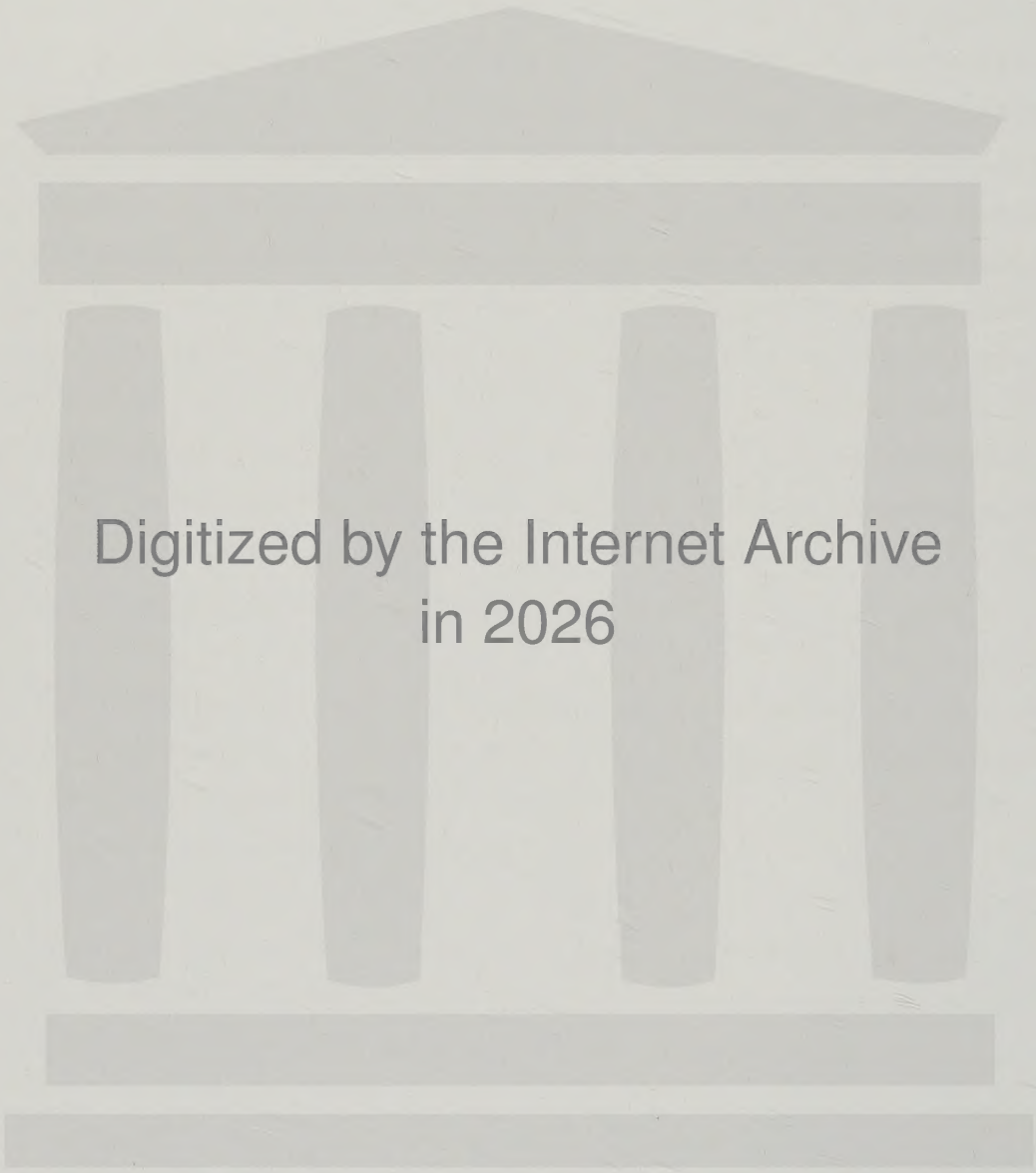
THESE DE DOCTORAT D'ETAT
ES-SCIENCES NATURELLES présentée
A L'UNIVERSITE PARIS VI
pour obtenir le grade de Docteur Es-Sciences
par **MARIE-JO BESSON**

Mécanismes de régulation de la biosynthèse et de la libération de la dopamine au niveau des terminaisons dopaminergiques du système nigro-striatal chez le rat et le chat

Soutenue le 10.10.73 devant la Commission d'Examen
Président
M. R. COUTEAUX
Examinateurs
Mme. D. ALBE-FESSARD
M. P. ASCHER


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548016_0026

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
ES-SCIENCES NATURELLES présentée
A L'UNIVERSITE PARIS VI
pour obtenir le grade de Docteur Es-Sciences
par **MARIE-JO BESSON**

Mécanismes de régulation de la biosynthèse et de la libération de la dopamine au niveau des terminaisons dopaminergiques du système nigro-striatal chez le rat et le chat

Soutenue le 10.10.73 devant la Commission d'Examen
Président
M. R. COUTEAUX
Examinateurs
Mme. D. ALBE-FESSARD
M. P. ASCHER

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon Père

A mes beaux-parents

A Jean-Marie, Jacques et Marc

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Neurophysiologie Générale et Biologie Moléculaire au sein du Groupe NB (U.114 - INSERM) au Collège de France.

Je remercie Monsieur le Professeur R. COUTEAUX de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le Jury de cette thèse.

Je suis très heureuse de pouvoir exprimer toute ma reconnaissance à Madame le Professeur D. ALBE-FESSARD qui, en m'accueillant dans son laboratoire, m'a permis de me diriger vers la recherche. Ses conseils, sa compétence et son soutien constant ont joué un rôle essentiel dans le déroulement de ce travail. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de mon admiration et de mes vifs remerciements.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur P. ASCHER de s'être intéressé à ce travail et d'avoir eu l'amabilité de le juger, connaissant sa rigueur scientifique et sa compétence en ce domaine.

J'exprime à Monsieur le Docteur J. GLOWINSKI toute ma reconnaissance pour avoir bien voulu m'accueillir dans son équipe de recherche et diriger ce travail. J'ai pu bénéficier de son enthousiasme et de son dynamisme pour la recherche ; ses nombreux conseils et ses encouragements m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'adresse à Monsieur le Professeur A. FESSARD ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour les encouragements qu'il a su prodiguer à notre équipe.

J'aimerais également remercier tous mes amis du laboratoire et plus particulièrement :

André CHERAMY et Christian GAUCHY avec qui j'ai eu des discussions bénéfiques sur les problèmes abordés dans ce travail et dont la collaboration efficace m'a permis de surmonter bien des difficultés.

Paul FELTZ et André CALAS avec qui j'ai abordé certains points de cette étude.

Enfin ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide à des titres divers de toute l'équipe N.B.

Je voudrais en particulier exprimer ma profonde reconnaissance à Simone HOURTE, Suzanne DE SMEDT et Liliane LEGOUAS qui savent si souvent réaliser l'impossible et contribuent à créer une ambiance cordiale dans le laboratoire.

Je remercie Madame LAPLANTE qui a effectué les contrôles histologiques, A. MENETREY, les illustrations de ce travail C. PENNARUM les travaux de photographie.

J'exprime à Madame P. BLANC tous mes remerciements pour son aide si précieuse à la préparation du manuscrit.

C'est à l'amabilité et à la compétence des membres du service d'impression du laboratoire de Physique Nucléaire du Collège de France que je dois la réalisation finale de ce mémoire et je les en remercie.

S O M M A I R E

INTRODUCTION 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 5

Historique 7

I - Anatomie de la voie nigro striatale 9

A) Données apportées par la technique d'histochimie de fluorescence 9

1) corps cellulaires 9

2) terminaisons 10

3) distribution somatotopique des fibres nigro-striées 10

4) études faites au cours de l'ontogénèse . 11

B) Données biochimiques obtenues après des lésions 12

1) lésions électrolytiques 12

2) lésions pharmacologiques 13

C) Etudes électrophysiologiques 14

II - Rôle fonctionnel des neurones nigro-striataux 17

A) Etudes pharmacologiques : effets de quelques drogues psychotropes provoquant des troubles du comportement moteur 17

1) Drogues à action stimulante 17

- L-DOPA
- Amphétamine
- Apomorphine

2) Les neuroleptiques 19

- Réserpine
- Butyrophénones et Phénothiazines

B) Données cliniques 20

C) Données expérimentales : reproduction de syndromes de type extrapyramidal 21

1) Lésions de l'aire tegmentaire ventrale chez le singe 21

2) Lésions faites chez le rat au niveau du

système nigro-striatal 22
III - Métabolisme de la Dopamine 25
A) Biosynthèse de la DA 25
1) Hydroxylation de la tyrosine en DOPA 25
2) Décarboxylation de la DOPA en DA 26
3) Contrôle de la synthèse 26
B) Inactivation de la DA 28
1) Inactivation enzymatique de la DA 28
2) Inactivation de la DA par recapture de l'amine 30

TECHNIQUES BIOCHIMIQUES 31
1 - Purification de la ^{3}H-tyrosine 31
2 - Séparation de la ^{3}H-DA 32
a) Fixation de la ^{3}H-DA sur une colonne d'amberlite 32
b) Adsorption de la ^{3}H-DA sur une colonne d'alumine 33
3 - Identification de la ^{3}H-DA par cochromatographie ... 33
4 - Dosages spectrofluorimétriques de la DA et de la tyrosine 35
a) Dosage de la DA 35
b) Dosage de la tyrosine 36
5 - Mesure de l'activité de la tyrosine hydroxylase 36
a) Préparation de la tyrosine hydroxylase 36
b) Mesure de l'activité de la tyrosine hydroxylase 37

Ière PARTIE : ETUDE DE LA LIBERATION ET DE LA SYNTHESE DE LA ^{3}H-DA "IN VITRO" 39
CHAPITRE I : LIBERATION DE LA ^{3}H-DA PREALABLEMENT SYNTHETISEE A PARTIR DE ^{3}H-TYROSINE PAR SUPERFUSION DU STRIATUM ISOLE DU RAT 41
Introduction 41
I - Technique de superfusion du striatum chez le rat ... 45
II - Libération spontanée de ^{3}H-DA 47
1 - Identification de l'amine libérée 47
2 - Analyse de l'histogramme des quantités de ^{3}H-DA libérée 47
3 - Etude des caractéristiques de diffusion des subs-

tances contenues dans les liquides extracellulaires 47
4 - Analyse en fonction du temps de superfusion des quantités de ^{3}H-DA libérées par rapport à celles présentes dans les tissus 51
III - Libération induite de ^{3}H-DA 55
1 - Effets provoqués par les dépolarisations non spécifiques 55
2- Effets de la d-amphétamine et de la β-phénylisopropylhydrazine (Catron$^{(R)}$) 55
3 - Effets de la Thiopropérazine 58
4 - Effet de l'acétylcholine (Ach) et de la sérotonine (5 HT) 61
1V - Discussion 67
CHAPITRE II : LIBERATION ET SYNTHESE DE LA ^{3}H-DA AU NIVEAU DE COUPES DE STRIATUM CHEZ LE RAT. EFFETS DE QUELQUES DROGUES PSYCHOTROPES.
Introduction 71
I - Techniques développées pour étudier la synthèse et la libération de ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum chez le rat 73
1 - Mesure de la libération et de l'accumulation de ^{3}H-DA 73
2 - Estimation de la synthèse réelle de ^{3}H-DA par la méthode de détermination de l'eau tritiée 74
II - Etude des effets de l'amphétamine sur la synthèse et la libération de ^{3}H-DA 81
1 - Effets de l'amphétamine sur la libération et l'accumulation de la ^{3}H-DA 81
2 - Comparaison des effets de l'amphétamine et de la desmethylimipramine sur la libération et l'accumulation de ^{3}H-DA 83
3 - Synthèse et accumulation de la ^{3}H-DA au niveau du striatum de rats prétraités avec de l'amphétamine 87
4 - Activité in vitro de la tyrosine hydroxylase après un prétraitement avec de l'amphétamine 90
5 - Synthèse de ^{3}H-DA et activité in vitro de la ty-

rosine hydroxylase après des injections répétées d'amphétamine 91
6 - Inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA au niveau du striatum en fonction de la dose d'amphétamine injectée 94
7 - Synthèse de la ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum incubées en présence de d- ou de l-amphétamine 94
8 - Discussion 96
III - Etude comparative des effets de deux neuroleptiques : la réserpine et la thiopropérazine sur la synthèse et la libération de ^{3}H-DA 101
1 - Synthèse de la ^{3}H-DA et activité "in vitro" de la tyrosine hydroxylase après une injection unique de réserpine ou de thiopropérazine 101
2 - Synthèse de la ^{3}H-DA et activité "in vitro" de la tyrosine hydroxylase après de injections répétées de réserpine ou de thiopropérazine 109
3 - Effets de la réserpine et de la thiopropérazine sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA 113
4 - Etudes complémentaires de certains effets provoques par la thiopropérazine 115
5 - Discussion 124

IIème PARTIE : ETUDE "IN VIVO" DE LA LIBERATION DE LA ^{3}H-DA .. 129
Introduction 131
I - Techniques utilisées dans l'étude de la libération de la DA "in vivo" 133
1 - Préparation des animaux 133
2 - Surveillance de l'animal 133
3 - Mise en place de la cupule 134
4 - Description de la cupule 134
5 - Marquage des terminaisons dopaminergiques du noyau caudé et mesur de la libération de ^{3}H-DA 136
II - Validité de la technique de la cupule pour l'étude "in vivo" de la libération de la DA..... 139
1 - Contrôles électrophysiologiques 139
2 - Contrôles histologiques 139

III - Libération de la ^{3}H-DA au niveau des terminaisons dopaminergiques du noyau caudé marquées préalablement avec de la ^{3}H-tyrosine 143

1 - Identification par cochromatographie de la ^{3}H-DA libérée et accumulée dans les tissus 143

2 - Analyse de la libération spontanée : effet de l'anesthésie 143

3 - Vitesse d'utilisation de la ^{3}H-DA accumulée dans les tissus 148

4 - Conclusion 148

IV - Libération de la ^{3}H-DA au niveau des terminaisons dopaminergiques marquées en continu avec de la ^{3}H-tyrosine 151

1 - Identification par cochromatographie de ^{3}H-CA libérées dans les superfusats et accumulées dans les tissus 151

2 - Analyse de la répartition de la ^{3}H-DA et de la ^{3}H-tyrosine au niveau du noyau caudé 153

3 - Libération spontanée de la ^{3}H-DA et mesure de l'accumulation de la ^{3}H-DA dans les tissus en fonction du temps de superfusion 153

4 - Discussion 155

V - Compartimentalisation et analyse du rôle fonctionnel des différentes formes de stockage de la DA 157

1 - Effet du Catron$^{(R)}$ sur la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée ou stockée depuis plus longtemps au niveau des terminaisons 157

2 - Libération de la ^{3}H-DA après inhibition de la synthèse de la DA 158

3 - Effet de la d-amphétamine sur la libération de la ^{3}H-DA avant et après inhibition de sa synthèse ... 160

4 - Effet d'un excés d'ions K^{+} sur la libération de la ^{3}H-DA avant et après inhibition de la synthèse . 164

5 - Discussion 166

VI - Influence de l'activité nerveuse sur la libération de la ^{3}H-DA 169

1 - Libération de la ^{3}H-DA après arrêt de l'activité neuronale. Effet de la tétrodotoxine et de la section de la voie nigro-striatale 169

2 - Effet de la stimulation de la substance noire . 170
3 - Effet de la stimulation de certaines régions mésencéphaliques 174
4 - Conclusion 177
VII - Etudes simultanées de la synthèse et de la libération de la ^{3}H-DA 179
A - Effet d'un inhibiteur de synthèse : l'αmpT 179
B - Influence de l'activité nerveuse 182
1 - Effet de la transection 182
2 - Effet de l'administration de thiopropérazine .. 182
C - Effet de l'inhibition des mécanismes d'inactivation de la DA 187
1 - Effet d'un inhibiteur de la recapture : la benzotropine 187
2 - Effet d'un inhibiteur de la MAO : la tranylcypromine 190
D - Conclusion 192

CONCLUSION GENERALE 195

A B R E V I A T I O N S

α mpT	α-méthyl-para-tyrosine
CA	Catécholamines
COMT	Catéchol-O méthyl transférase
DA	Dopamine
DOPA	Dihydroxyphénylalanine
6-OH-DA	6-hydroxydopamine
^3H-H_2O	Eau tritiée
IMAO	Inhibiteur de la monoamine oxydase
MAO	Monoamine oxydase
NA	Noradrénaline
5 HT	Sérotonine
SNC	Système nerveux central
SN	Substance noire
TZ	Thiopropérazine

A N N E X E

Composition de la solution stabilisatrice de la ^{3}H-DA.

EDTA	2 %
$Na_2S_2O_5$	1 %
DA	0, 0002 %

- Composition du liquide physiologique.

(Concentration en millimoles).

NaCl 126,5 ; NaHCO 27,5 ; KCl 2,4 ; KH_2PO_4 0,5 ; $CaCl_2$ 1,1; $MgCl_2$ 0,83 ; Na_2SO_4 0,5 ; glucose 5,9.

Le pH de la solution est ajusté à 7,3 avec un mélange d'O_2 - CO_2 (95 = 5)

Produits radioactifs utilisés.

L- 3-5 ^{3}H-tyrosine : The Radiochemical Center (Amersham, Buckinghamshive, England) et CEA (Gif/Yvette).

^{3}H-Dopamine : The Radiochemical Center et CEA (Gif/Yvette).

PRODUITS UTILISES.

- d ou l-amphétamine (sulfate). Rhône Poulenc.
- Atropine (sulfate). Rhône Poulenc.
- Catron, JB 516 ou phényl isopropylhydrazine; Regis chemical Co . Chicago.
- Desmethyl imipramine (chlorhydrate). Rhône Poulenc.
- Esérine (salicylate). Rhône Poulenc.
- Flaxedil (triiodoethylate de gallamine). Specia.
- Fluothane (halothane). Avlon.
- Kétamine (chlorhydrate). Parke Davis.
- α méthyl-para-tyrosine (DL méthyl ester hydrochlorure). AB Hässle. Göteborg.
- Penthothal (sodique). Lathevet.
- Penthrane(methoxyflurane). Abbott.
-Reserpine. Serpasil Ciba.
- Thiopropérazine (bis méthane sulfonate). Rhône Poulenc.
- Tranylcypromine Théraplix
- Xylocaïne (lignocaïne 2 %). Roger Bellon

INTRODUCTION

Le rôle de médiateur chimique dans la transmission synaptique de l'influx nerveux ne peut être attribué à une substance que si elle satisfait à plusieurs critères. Celle-ci doit être synthétisée au niveau des terminaisons, libérée par activation des neurones puis dégradée au niveau de la synapse. Ces critères ne sont cependant pas suffisants par eux mêmes pour démontrer d'une manière irréfutable qu'une substance donnée agit comme un transmetteur. Des preuves complémentaires doivent être apportées par des études électrophysiologiques. Notamment il faut que l'application de cette substance au niveau des récepteurs post synaptiques reproduise les effets de la stimulation du neurone. De plus ces effets doivent être antagonisés ou renforcés par les mêmes agents antagonistes ou agonistes de la réponse à la stimulation électrique. C'est ainsi que l'on a pu identifier et attribuer un rôle de médiateur chimique à l'acétylcholine dans la transmission de l'influx nerveux au niveau du système nerveux périphérique et en particulier au niveau du ganglion sympathique et de la jonction neuromusculaire. Pour diverses raisons, de telles études n'ont été que partiellement réalisées au niveau du système nerveux central. Tout d'abord les structures cérébrales ne peuvent être facilement atteintes. De plus la complexité des inter-relations entre les neurones ne facilite pas l'identification des synapses correspondant à un système neuronal déterminé.

Cependant la localisation de plusieurs systèmes de neurones dits aminergiques a pu être établie dans le système nerveux central grâce au développement des techniques histochimiques de fluorescence

(Falck, Hillarp et coll. 1962). L'étude du rôle des monoamines dans la transmission de l'influx nerveux a de ce fait pris un essor considérable. Les premières cartographies des systèmes de neurones monoaminergiques furent établies par les chercheurs de l'école suédoise. Dahlström et Fuxe ont décrit de façon assez détaillée la localisation des groupes cellulaires NA, DA et 5HT ainsi que celles de leurs terminaisons (Dahlström et Fuxe 1964, 1965 ; Fuxe 1965 a et b).

Parmi ces différents systèmes de neurones aminergiques nous nous sommes particulièrement interéssés au système nigro-striatal dopaminergique dont les corps cellulaires sont localisés dans la pars compacta de la substance noire, et les terminaisons dans le noyau caudé (Anden et coll. 1964 - 1965). Plusieurs raisons ont guidé le choix de ce système :

- D'une part des données anatomiques cliniques et expérimentales révèlent l'apparition de troubles de la motricité : maladie de Parkinson chez l'homme (Hornykiewicz 1966), hypokinésie et tremblement chez l'animal (Poirier et Sourkes 1965), lorsque ce système est déficient.
- D'autre part des données histochimiques et biochimiques révèlent la présence dans le noyau caudé de très nombreuses terminaisons dopaminergiques (Hökfelt 1968) et des concentrations en DA dix fois supérieures à celles mesurées partout ailleurs dans le système nerveux central (Bertler et Rosengren 1959 ; Carlsson 1959).

Les principales études biochimiques effectuées sur ce système donnent une analyse des effets de certaines drogues psychotropes sur le métabolisme de la DA.

Deux grandes voies d'approches sont utilisées :

1° - La mesure de la disparition ou de l'accumulation de l'amine après administration de drogues inhibant la synthèse ou la dégradation de la DA. (Costa et Neff 1966)

2° - L'estimation des vitesses d'utilisation

- de l'amine radioactive injectée en quantités traceuses et préalablement captée dans les neurones dopaminergiques où elle se comporte comme l'amine endogène (Milhaud et Glowinski 1962 ; Iversen et Glowinski 1966)

- de l'amine synthétisée à partir de son précurseur radioactif. (Nÿback et Sedvall 1968 - 1969 ; Nÿback et coll 1968).

Très peu de travaux sont consacrés à l'évaluation de la synthèse réelle de la DA et à l'étude de sa régulation au niveau des terminaisons dopaminergiques. De plus les mécanismes de libération de la DA au niveau du noyau caudé sont très peu étudiés étant donné que les très faibles quantités d'amines libérées sont difficilement mesurables par les méthodes de dosage spectrofluorimétriques classiques (Mac Lennan 1964 ; Portig et Vogt 1966, 1969 ; Mc Kenzie et Szerb 1968)

Le travail que nous avons entrepris s'insère dans un cadre général de recherche à long terme sur le rôle du système dopaminergique nigro-striatal dans les mécanismes extrapyramidaux. Il a été initialement entrepris avec la collaboration de P. Feltz de l'équipe de Madame Albe Fessard. Ce groupe a réalisé une étude électrophysiologique très détaillée des relations existant entre la substance noire et le noyau caudé (Albe Fessard 1967, 1970 ; Feltz et Mc Kenzie 1969 ; Feltz et Albe Fessard 1972). Ce travail est d'autre part complémentaire de celui réalisé dans notre laboratoire par les Docteurs F. Javoy et Y. Agid sur l'analyse du métabolisme de la DA au niveau du système dopaminergique nigro-striatal chez le rat (Javoy 1972) et des régulations interneuronales intervenant dans le fonctionnement de ce système (Javoy et coll. 1973).

Nous nous sommes particulièrement interéssés à l'étude

- des mécanismes de libération de la DA au niveau du noyau caudé chez le rat puis chez le chat.
- des relations existant entre les processus de libération et de synthèse du médiateur.

A cet effet une technologie originale nous permettant d'apprécier simultanément la synthèse et la libération de la DA a été développée. Schématiquement la 3H DA est synthétisée à partir de 3H-tyrosine dans les terminaisons dopaminergiques du noyau caudé, puis libérée sous l'influence de l'activité nerveuse. La très grande sensibilité des techniques radioactives utilisées et l'activité spécifique élevée du précurseur permettent de mesurer les très faibles quantités d'amines libérées. De plus il est possible d'évaluer la synthèse de

l'amine en mesurant l'eau tritiée formée lors de l'hydroxylation de la L, 3-5 3H-tyrosine en 3H-DOPA.

La première partie de ce travail correspond à une étude réalisée in vitro au niveau du néostriatum (putamen-noyau caudé) chez le rat. Les terminaisons dopaminergiques du striatum isolé sont préalablement marquées avec de la 3H-DA synthétisée à partir de la 3H-tyrosine, puis superfusées afin de mesurer la libération spontanée ou induite de la 3H-DA. D'autre part des coupes de striatum sont incubées en présence de 3H-tyrosine afin d'étudier les effets sur la synthèse et la libération de la 3H-DA de certaines drogues psychotropes préalablement administrées aux animaux.

La deuxième partie de ce travail est une étude faite in vivo chez le chat. La libération de la 3H-DA est mesurée, à l'aide d'une cupule spécialement adaptée, au niveau d'une partie limitée de la surface ventriculaire du noyau caudé, après décortication partielle de l'animal. Cette étude in vivo a été développée parallèlement aux études faites in vitro ; ce n'est que par des progrés successifs réalisés in vitro que nous avons trouvé les conditions optimales à l'étude de la libération de la 3H-DA in vivo ; c'est pourquoi deux méthodologies ont été utilisées.
La libération de la 3H-DA est mesurée au niveau des terminaisons dopaminergiques du noyau caudé marquées avec de la 3H-tyrosine introduite dans la cupule de façon "aigue" ou "continue".
La superfusion continue avec de la 3H-tyrosine permet d'obtenir un index de la synthèse de la 3H-DA, en mesurant dans le liquide de superfusion la diffusion de l'^{3}H-H_2O formée au cours de la conversion de la 3H-tyrosine en 3H-DOPA. Des corrélations entre les modifications de synthèse et de libération de la 3H-DA peuvent ainsi être établies in vivo.

Avant d'aborder l'étude de nos résultats expérimentaux, il nous a paru important de rappeler certaines données concernant d'une part l'anatomie et le rôle fonctionnel des neurones dopaminergiques nigro-striataux et d'autre part le métabolisme de la DA.

R A P P E L S B I B L I O G R A P H I Q U E S

HISTORIQUE

La présence de DA dans le cerveau des mammifères fut initialement considérée comme normale puisque cette substance était présumée jouer uniquement le rôle de précurseur de la NA mise en évidence quelques années auparavant par M. Vogt (1954). Cependant Carlsson et coll. (1958), Schümann (1959) constatent que la DA représente plus de la moitié des catécholamines totales du cerveau; ces résultats n'étaient donc pas en faveur d'un rôle exclusif de la DA comme précurseur de la NA. En 1959, Bertler et Rosengren d'une part, Carlsson d'autre part montrent que la distribution régionale de la DA est très différente de celle de la NA dans le cerveau des mammifères. Notamment les concentrations de DA sont très importantes dans le néostriatum alors que celles de NA sont très faibles dans cette structure. Ces auteurs suggèrent alors l'existence d'un système de neurones dopaminergiques oùla DA jouerait le rôle de médiateur chimique. Une distribution similaire de la DA et de la NA est retrouvée dans le cerveau chez l'homme (Erhinger et Hornykiewicz 1960). De plus , Erhinger et Hornykiewicz (1960) constatent que la DA est particulièrement diminuée au niveau du noyau caudé chez des sujets atteints de la maladie de Parkinson. Par la suite Hornykiewicz (1963) montre que la diminution de la DA striatale est accompagnée d'une dégénérescence des cellules de la substance noire. Ces données biochimiques donnent alors un intérêt nouveau aux observations originales de Trétiakoff (1919) confirmées ensuite par Hassler (1938), soulignant l'existence de lésions au niveau de la substance noire dans la maladie de Parkinson. Il en est de même pour le parkinson expérimental produit chez le singe après certaines lésions effectuées dans le mésencéphale (Poirier 1960).

Sur la base des résultats biochimiques et cliniques,en 1964 Hornykiewicz propose l'existence d'un système de neurones dopaminergiques nigro-striataux ayant un rôle physiologique propre.

Différentes recherches ont contribué à confirmer cette hypothèse : D'une part 1) la visualisation des systèmes monoaminergiques centraux obtenue grâce au développement des techniques histochimiques de fluorescence mises au point par Falck, Hillarp et coll. (1962)

2) des études biochimiques éffectuées après des lésions des neurones nigro-striataux ;

3) des études électrophysiologiques ont précisé l'existence d'une voie nigro striatale dopaminergique.

D'autre part 1) des études pharmacologiques ;

2) des études cliniques ;

3) des études comportementales réalisées après des lésions électrolytiques ou pharmacologiques du système nigro-striatal ont précisé le rôle physiologique de ces neurones.

La suite de ce chapitre est consacrée à l'analyse des données apportées par ces différentes études.

I . - ANATOMIE DE LA VOIE NIGRO-STRIATALE

A - DONNEES APPORTEES PAR LA TECHNIQUE D'HISTOCHIMIE DE FLUORESCENCE-

Anden et coll. (1964) démontrent que des lésions de la substance noire, localisées au niveau de la pars compacta, entraînent une réduction importante des taux de DA au niveau du noyau caudé. Celle-ci est associée à une diminution de fluorescence dépendant de l'extension de la lésion. Le trajet des fibres du système nigro-striatal est ensuite déterminé par dégénérescence rétrograde après ablation du néostriatum (Anden et coll. 1965).

1 - LES CORPS CELLULAIRES -

Parmi les groupes cellulaires monoaminergiques du tronc cérébral identifiés par A. Dahlström et K. Fuxe (1964), un seul groupe cellulaire, le groupe A_9 localisé dans la zona compacta de la substance noire réagit à l'ablation du néostriatum en développant une fluorescence accrue 2 à 4 jours après l'opération, puis présente 3 à 4 semaines plus tard une réduction très nette de fluorescence. Cette perte de fluorescence est accompagnée d'une réduction du volume cellulaire et d'une perte de coloration des corps de Nissl.

Une étude plus approfondie (Ungerstedt 1971) démontre que le groupe cellulaire A_8 (selon la nomenclature établie par Dahlström et Fuxe 1964) appartient également, du moins en partie, au système nigro-striatal puisqu'une atrophie est observée à ce niveau après ablation du noyau caudé-putamen. Inversement, les corps cellulaires des groupes A_8 et A_9 présentent une intensité de fluorescence très

marquée après administration de DOPA (Butcher et coll. 1970).

2 - LES TERMINAISONS -

Des terminaisons nerveuses très nombreuses et de très petite taille, contenant de la DA, ont également pu être mises en évidence au niveau du striatum, par les méthodes histochimiques de fluorescence (Fuxe et coll. 1964 ; Fuxe 1965 a ; Fuxe et Anden 1966 ; Anden et coll. 1966 b).

Plus récemment, Llamas et Reinoso-Suarez (1969), puis Moore et coll. (1971), utilisant les techniques histologiques classiques, observent la dégénérescence de très fines terminaisons au niveau du noyau caudé après des lésions de la substance noire. Cette dégénérescence est associée à une chute importante de la DA striatale (Moore et coll. 1971).

Dans une étude quantitative assez grossière, Anden et coll. (1966 c) évaluent approximativement la concentration de DA dans les terminaisons dopaminergiques nigro-striatales et déduisent ainsi que l'arborisation terminale de chaque neurone présente, un grand nombre de varicosités (5×10^5) ; ceci illustre la divergence de ce système. D'autre part, dans une étude faite en microscopie électronique, Hökfelt (1968) estime que les terminaisons dopaminergiques représentent environ 15 % des terminaisons totales du striatum. Ces résultats soulignent la complexité de la structure nerveuse du striatum.

3 - DISTRIBUTION SOMATOTOPIQUE DES FIBRES NIGRO-STRIEES -

la distribution des fibres dopaminergiques se projetant au niveau du néostriatum , a pu également être analysée en utilisant les techniques d'histochimie de fluorescence.

Une lésion rostrale du néostriatum entraîne la dégénérescence des cellules rosto-médianes de la substance noire, alorsqu'une lésion effectuée au niveau du putamen caudal provoque une perte cellulaire localisée dans la partie latéro-caudale de la substance

noire (Bédard et coll. 1969). Les fibres striato-nigrales se répartissent d'ailleurs de façon analogue.

Butcher et coll. (1970) montrent également que les fibres nigro-striatales se répartissent en 2 faisceaux ne présentant pas la même augmentation de fluorescence après administration de L DOPA et un inhibiteur de la décarboxylase périphérique. Les corps cellulaires dopaminergiques localisés dans la substance noire latérale et la formation réticulée mésencéphalique, ainsi que les terminaisons situées dans la partie latéro dorsale du néostriatum présentent une fluorescence plus marquée que les corps cellulaires et les terminaisons dopaminergiques contenues respectivement dans la région médiane de la substance noire et la partie médio ventrale du néostriatum.

4 - ETUDES FAITES AU COURS DE L'ONTOGENESE -

Les méthodes d'histochimie de fluorescence ne permettent pas de tracer le trajet complet des fibres dopaminergiques chez l'animal adulte ; en effet la fluorescence n'est visible qu'au niveau des corps cellulaires et des terminaisons. Par contre une fluorescence intense peut être observée au niveau des axones des neurones catécholaminergiques pendant la période prénatale et postnatale très précoce ; ceci facilite l'établissement de leurs cartographies sans avoir recours à des traitements pharmacologiques complexes (Maeda et Dresse 1968). Les neurones nigro-striataux ont pu être ainsi visualisés sur toute leur longueur, ce qui démontre sans ambiguité la nature monosynaptique de la voie dopaminergique nigro-striatale (Olson et coll. 1972 ; Loizou 1972 ; Tennyson et coll. 1972). Par ailleurs le système dopaminergique nigro-striatal est le système monoaminergique le plus développé morphologiquement à la naissance (Loizou 1972). Pendant la période postnatale précoce, une prolifération des terminaisons dopaminergiques striatales peut être observée; elle se traduit par une augmentation de l'activité des enzymes responsables de la biosynthèse de la DA (Loizou 1972), des mécanismes de capture de l'amine (Tennysson et coll. 1972) et d'une augmentation progressive des taux de DA.

Les études faites chez le foetus ou chez l'animal au cours de la période postnatale précoce révèlent une hétérogénéité du système dopaminergique nigro-striatal. En effet, des îlots bien circonscrits de fluorescence sont observés entre des terminaisons dopaminergiques moins fluorescentes (Olson et coll. 1972 ; Loizou 1972 ; Tennysson 1972). Ces îlots fluorescents visibles chez l'animal jeune suggèrent la présence d'un système dopaminergique ayant les caractéristiques anatomiques et des fonctions différentes de celles du système dopaminergique décrit classiquement. Olson et coll. (1972) retrouvent la présence des îlots fluorescents chez l'animal adulte après traitement des animaux avec de l'αmpT ; l'inhibiteur de la synthèse des CA entraînant une disparition plus rapide de la fluorescence diffuse que de celle localisée au niveau des îlots.

B - DONNEES BIOCHIMIQUES OBTENUES APRES DES LESIONS -

De nombreuses études biochimiques effectuées après des expériences de lésions ont contribué à démontrer l'existence de la voie dopaminergique nigro-striatale.

1 - LESIONS ELECTROLYTIQUES -

Poirier et Bourbes (1965) effectuent chez le singe des lésions au niveau de l'aire tegmentale ventromédiane. Ils établissent ainsi des corrélations entre la localisation de la lésion et la chute de la DA striatale. Seule la lésion faite au niveau de la pars compacta de la substance noire provoque une diminution de la DA striatale ipsilatéralement. Ces résultats sont confirmés par Goldstein et coll. (1966) chez le singe et par Poirier et coll. (1967 a) puis Pin et coll. (1969) chez le chat.

Après ces lésions, la biosynthèse <u>in vivo</u> de la DA à partir de ^{14}C tyrosine est très abaissée (Goldstein et coll. 1966) et la capacité d'accumulation de la ^{3}H-DA est considérablement diminuée au niveau du striatum (Goldstein et coll. 1967).

A l'aide de la microscopie électronique, Hokfelt et Ungerstedt (1969) constatent une réduction très importante du nombre de terminaisons capables d'accumuler l'αméthyl NA au niveau du striatum après lésion de la pars compacta de la substance noire.

2 - LESIONS PHARMACOLOGIQUES -

Tranzer et Thoenen (1968) montrent à la périphérie que la réduction des taux de NA consécutive à des injections de 6 OH-DA est provoquée par la dégénérescence des terminaisons noradrénergiques. Comme cette substance ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, Ungerstedt (1968), Uretsky et Iversen (1969) injectent directement la 6 OH-DA dans le cerveau, afin d'entraîner la dégénérescence sélective de neurones catécholaminergiques centraux.

Ungerstedt (1968) démontre histochimiquement la dégénérescence totale des systèmes de neurones nigro-striataux dopaminergiques à la suite d'une injection de 6 OH-DA réalisée au niveau de la pars compacta de la substance noire.

Uretsky et Iversen (1970) montrent que la DA striatale diminue et que les mécanismes de capture de la DA sont pratiquement inexistants après une injection intraventriculaire de 6 OH-DA.

Cette technique permet de retrouver des résultats analogues à ceux obtenus après des lésions électrolytiques. De plus , elle favorise l'étude du rôle fonctionnel d'un système de neurones déterminé sans détruire les neurones avoisinants.

C - ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES -

Des études électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence deux types de réponses au niveau des cellules du noyau caudé, après stimulation de la substance noire. Celle-ci déprime l'activité de cellules spontanément actives (Albe Fessard et coll. 1967) ou activées par application d'acides aminés excitateurs (Connor 1968).

D'autre part une réponse d'excitation est enregistrée extracellulairement (Albe Fessard et coll. 1967 ; York 1967 ; Frigyesi et Purpura 1967, Connor 1968, Feltz et Mac Kenzie 1969) ou intracellulairement Hull et coll. 1970) au niveau de cellules présentant une activité spontanée faible ou nulle.

Il ne semble pas exister de corrélations entre la réponse d'activation, conduite probablement par une voie monosynaptique nigro-striatale (Feltz et Albe Fessard 1972), et l'effet excitateur induit par application de DA (Connor 1970 - 1971). D'ailleurs, la réponse d'excitation obtenue par stimulation de la substance noire persiste après destruction des terminaisons dopaminergiques provoquée par des injections répétées de 6 OH-DA dans les ventricules latéraux (Feltz et de Champlain 1972). Le système de neurones dopaminergiques n'est vraisemblablement pas mis en cause dans la réponse d'excitation obtenue par stimulation de la substance noire.

L'administration iontophorétique de DA déprime les cellules présentant une activité spontanée ou induite par des acides aminés excitateurs (Bloom et coll. 1965 ; Herz et Zieglgänsberger 1966 ; Mac Lennan et York 1967). Il apparait généralement une bonne corrélation entre les effets de la stimulation de la substance noire et ceux produits par l'injection iontophorétique de la DA [illegible] certains neurones du noyau caudé (Connor 1970 - 1971). De plus l'injection iontophorétique d'αméthyl DA, substance se comportant comme un faux médiateur, bloque les effets inhibiteurs observés après stimulation de la substance noire et injection locale de DA.

L'ensemble de ces résultats indique que la voie monosynaptique nigro-striatale dopaminergique exerce essentiellement une influence inhibitrice sur certaines cellules du noyau caudé, et qu'il existe au moins deux voies nigro-striatales, l'une dopaminergique et l'autre non catécholaminergique. Cette dernière éventualité est également discutée par Fibiger et coll. (1972) à la suite de leurs études sur le transport axonal dans les systèmes nigro-striataux. En effet,un pic de radioactivité apparait au niveau du noyau caudé , un certain temps après l'injection de ^{14}C leucine dans la substance noi-

re. Ces expériences confirment tout d'abord la nature monosynaptique de la voie nigro-striatale. Mais de plus des ^{14}C protéines en quantité moindre sont encore transportées au niveau du noyau caudé après destruction des terminaisons dopaminergiques par l'administration préalable de 6 OH-DA . Ces dernières observations suggèrent également l'existence d'une autre voie nigro-striatale distincte de la voie dopaminergique.

II . - ROLE FONCTIONNEL DES NEURONES NIGRO-STRIATAUX

Différentes données pharmacologiques, cliniques et expérimentales révèlent l'importance du système dopaminergique nigro-striatal dans le contrôle de la motricité.

A - ETUDES PHARMACOLOGIQUES : EFFETS DE QUELQUES DROGUES PSYCHOTROPES PROVOQUANT DES TROUBLES DU COMPORTEMENT MOTEUR CHEZ L'ANIMAL.

Très rapidement, nous mentionnerons l'action de certaines drogues qui stimulent ou au contraire réduisent le comportement moteur chez l'animal.

1 - DROGUES A ACTION STIMULANTE -

a - La L-DOPA -

Cette drogue qui est utilisée chez l'homme pour corriger des syndromes parkinsoniens, provoque par elle même des effets secondaires. La L-DOPA induit une activation du système autonome et du système nerveux central et provoque un éveil cortical et comportemental (Marley 1966, Jones 1970). Les effets périphériques de la DOPA peuvent être diminués en traitant les animaux avec un inhibiteur de la DOPA décarboxylase périphérique. A faible dose, cette drogue interfère peu avec l'enzyme cérébral puisque les taux des CA sont augmentées dans le cerveau (Bartholini et coll. 1967) et en particulier les taux intraneuronaux de DA (Bartholini et Pletscher 1968, Butcher et Engel 1969). Les taux de 5 HT sont par contre diminués après un traitement avec la L-DOPA (Bartholini et coll. 1968) par suite vraisemblablement d'un déplacement de cette amine par la DA formée. L'administration d'une faible dose de L-DOPA, chez des rats préalablement traités avec un inhibiteur de la DOPA décarboxylase, stimule l'activité locomotrice et provoque des mouvements stéréotypés de la tête et des membres

antérieurs (Bartholini et coll. 1969, Butcher et Engel 1969, Butcher et coll. 1970).

b - L'amphétamine -

Cette drogue excitante du système nerveux central induit chez l'animal des stéréotypies et une augmentation de l'activité locomotrice (Randrup et Munkvad 1966)

L'augmentation de l'activité locomotrice est souvent attribuée aux effets de l'amphétamine au niveau des neurones noradrénergiques Carlsson et Lindqvist 1967, Sulser et coll. 1968) ou d'autres systèmes neuronaux (Creese et Iversen 1972).

Il semble par contre généralement admis que les stéréotypies sont dues à l'action de la drogue au niveau des neurones dopaminergiques nigro-striataux (Van Rossum et Hurkmans 1964, Scheel Kruger et Randrup 1967 ; Randrup et Munkvad 1968 ; Taylor et Snyder 1971 ; Iversen 1971).

Les stéréotypies induites par l'amphétamine sont antagonisées par différents agents pharmacologiques : en particulier, les inhibiteurs de synthèse des CA (Weissman et Koe 1965) , les neuroleptiques (Randrup et Munkvad 1965, Del Rio Fuentes 1969, Lemberger et coll. 1970), les drogues cholinergiques (Arnfred et Randrup 1968).

Inversement,les IMAO et les antidepresseurs potentialisent les effets de l'amphétamine (Sulser et coll. 1966, Consolo et coll. 1967, Herman 1967).

c - L'apomorphine -

Injectée par voie systémique, elle produit également des stéréotypies (Ther et Schramm 1962, Ernst 1965). Ces stéréotypies ne sont pas modifiées par un prétraitement des animaux avec de la réserpine ou un inhibiteur de la synthèse des CA (Ernst 1967, Anden et coll. 1967), mais par contre antagonisées par les bloquants des récepteurs dopaminergiques tels que les neuroleptiques du type butyrophénone ou phénothiazine(Ernst 1969).Le mécanisme d'action proposé pour interpréter.les effets de l'apomorphine, est la stimulation directe des récepteurs dopaminergiques (Ernst 1967 ; Anden et coll. 1967). L'analogie de structure de la dopamine avec une partie de la molécule d'apomorphine renforce cette hypothèse (Ernst 1969).

2 - LES NEUROLEPTIQUES -

Les neuroleptiques utilisés en psychiatrie pour leur action antipsychotique qui est encore mal connue, ont par ailleurs un certain nombre d'effets secondaires se manifestant principalement par des syndromes de type extrapyramidal.

a - La réserpine -

Elle empêche l'incorporation des monoamines au niveau des vésicules (Carlsson et coll. 1963 ; Dahlström et coll. 1965) et provoque une réduction importante du taux de NA (Holzbauer et Vogt 1965), de DA (Carlsson et coll. 1958 ; Costa et coll. 1962), et de SHT (Pletsher et coll. 1956). L'amine dissociée de son site de stockage est détruite intraneuronalement par la MAO (Youdim et Sandler 1968).

Cette drogue provoque chez l'animal un état cataleptique caractéristique (Bein 1953, 1956) qui peut être corrigé par l'administration de DOPA (Carlsson et coll. 1957, Blaschko et Chrusciel 1960, Smith et Dews 1962) ou même complètement renversé par l'injection d'amphétamine (Smith 1963, Rech 1964, Stock et Rech 1968 - 1968). De plus Carlsson et Lindquist (1967) observent chez la souris que le syndrome reserpinique peut être complètement bloqué si la DA est sélectivement protégée de l'action de la réserpine.

Ces résultats soulignent l'importance des neurones dopaminergiques nigro-striataux dans l'apparition de ce syndrome.

b - Les butyrophénones et les phénothiazines.

Parmi ces neuroleptiques, l'haloperidol et la chlorpromazine ont été les plus étudiés. Ils provoquent un syndrome de type parkinsonien (Delay et Deniker 1961, Bernheimer et Hornykiewicz 1965 a) qui n'est pas corrigé par la DOPA (Mac Geer et coll. 1961) ni par l'amphétamine (Sulser et Dingell 1968 ; Del Rio et Fuentes 1969). Par ailleurs ces neuroleptiques provoquent une activation du métabolisme de la DA des neurones dopaminergiques nigro-striataux. Ceci se traduit par une augmentation des métabolites métoxylés des CA (Carlsson et Lindqvist 1963) ainsi que des métabolites acides Anden et coll. 1964 a, Laverty et Sharman 1965, Da Prada et Pletscher 1966, O'Keefe et coll. 1970). De même après inhibition de la synthèse de la DA, l'utilisation de l'amine est accrue (Neff et

Costa 1966, Corrodi et coll. 1967, Javoy et Golwinski 1971). L'activation des neurones dopaminergiques est interprétée comme étant un mécanisme compensateur consécutif à un blocage des récepteurs dopaminergiques (Carlsson et Lindqvist 1963, Van Rossum 1966).

Les drogues anticholinergiques corrigent la catalepsie induite par les neuroleptiques (Morpurgo 1962) ainsi que l'augmentation du métabolisme de la DA (Anden et Bédard 1971, Corrodi et coll. 1972).

Toutes ces études pharmacologiques révèlent par conséquent un parallélisme entre des modifications du métabolisme de la DA, et certains troubles du comportement moteur.

B - DONNEES CLINIQUES -

La maladie de Parkinson est associée à la dégénérescence des neurones nigro-striataux (Hassler 1955, Jung et Hassler 1960, Hornykiewicz 1966), qui se traduit par une déficience de la DA au niveau du complexe nigro-strié (Ehringer et Hornykiewicz 1960 ; Hornykiewicz 1963 ; Bernheimer et coll. 1963). Un grand nombre d'observations indiquent que la déficience de la DA striatale est spécifique de la maladie de Parkinson. Notamment le traitement des malades avec un inhibiteur de la monoamino-oxydase qui augmente considérablement les taux des monoamines cérébrales (NA et 5-HT) ne rétablit pas des taux normaux de DA (Bernheimer et coll. 1963). Barolin et coll. (1964) observent dans un cas d'hémiparkinson que la DA striatale est particulièrement diminuée du côté opposé à celui où apparaissent les syndromes parkinsoniens. D'autre part les taux d'acide homovanillique (HVA) sont très faibles au niveau du noyau caudé, du putamen, de la substance noire chez les parkinsoniens (Bernheimer et Hornykiewicz 1965 b). De plus chez ces malades, les concentrations de HVA n'augmentent pas après administration de probénécide (Olsson et Roos 1969), un inhibiteur du transport de ce métabolite. Ces résultats révèlent donc l'existence d'une relation entre les syndromes parkinsoniens et la diminution du taux de DA visible au niveau du système nigro-striatal. La déficience de DA peut

d'ailleurs être supplée par l'administration de L-DOPA, le précurseur immédiat de la DA. Ce traitement améliore notamment les syndromes d'akinésie et de rigidité chez les parkinsoniens (Birkmayer et Hornykiewicz 1961 ; Barbeau et coll. 1961 ; Cotzias et coll. 1967 - 1969). Les effets de la L-DOPA peuvent être interprétés de différentes façons. La plus généralement admise est que la DOPA décarboxylase dont l'activité n'est pas nulle chez les parkinsoniens (Llyod et Hornykiewicz 1970) permet la formation de DA en quantité suffisante, à partir de la L-DOPA injectée, pour rétablir le déséquilibre (Hornykiewicz 1970). L'utilisation de la DA est en effet augmentée au cours du traitement avec de la L-DOPA puisque les taux de HVA augmentent dans le liquide cérébrospinal (Weiner et coll. 1969).

C - DONNEES EXPERIMENTALES : REPRODUCTION DE SYNDROME DE TYPE EXTRA-PYRAMIDAL.

1 - LESION DE L'AIRE TEGMENTAIRE VENTRALE CHEZ LE SINGE -

Cette lésion provoque la disparition de la DA striatale et la dégénérescence rétrograde des cellules de la substance noire (Poirier et Sourkes 1965). De plus, après une lésion unilatérale, une hypokinésie apparaît au niveau du membre contralatéral à la lésion (Sourkes et Poirier 1966 ; Stern 1966 ; Goldstein et coll. 1969). L'interruption bilatérale des systèmes nigro-striés provoque un état akinétique ou même de la catalepsie chez le singe (Ranson 1939 ; Collins 1954) ainsi que chez le chat (Jones et coll. 1969). De plus le déficit moteur obtenu après une atteinte du système nigro striatal est accru par la lésion d'un autre système. Larochelle et coll. (1970) obtiennent un tremblement postural, chez des singes ayant une lésion au niveau de la boucle rubro-olivo-cérébello rubrale, en traitant les animaux avec de l'harmaline. Cette drogue est supposée agir sur les neurones nigro-striataux. Ces auteurs considèrent que le tremblement postural implique l'atteinte concomittante des mécanismes nigro-striés dopaminergiques et du complexe rubro-cérébelleux. En effet des drogues interférant avec le métabolisme de de la DA provoquent un tremblement postural chez des singes porteurs

d'une lésion au niveau de cette boucle (Bédard et coll. 1970 ; Larochelle et coll. 1971).

2 - ATTEINTE DU SYSTEME NIGRO-STRIATAL CHEZ LE RAT -

La lésion unilatérale du système nigro-striatal obtenue par ablation du noyau caudé (Anden et coll. 1966 a) ou par dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques consécutive à l'injection de 6-OH-DA au niveau de la substance noire (Ungerstedt 1968 ; Ungerstedt et Arbuthnott 1970) provoque une assymétrie de la posture et des mouvements.

Un déséquilibre entre l'activité des deux systèmes de neurones dopaminergiques induit une rotation de l'animal du côté opposé au côté le plus actif. C'est ainsi que chez le rat, des injections de DA dans un noyau caudé (Ungerstedt et coll. 1969) ou la diminution des taux de DA au niveau d'un seul noyau caudé (Anden et coll. 1970) provoquent la rotation de l'animal du côté où la concentration en DA est la plus basse.

De même, chez le rat porteur d'une lésion unilatérale du système nigro-striatal, l'activation des neurones dopaminergiques du côté intact par la DOPA (Anden et coll. 1966 a) ou l'amphétamine (Ungerstedt 1971 a), induit la rotation de l'animal du côté de la lésion. L'apomorphine, un stimulant des récepteurs dopaminergiques (Ernst 1967), entraîne chez le rat ayant une ablation unilatérale du noyau caudé, une rotation du côté de la lésion (Anden et coll. 1967). Par contre, cette même drogue, provoque chez le rat, après dégénérescence d'un système nigro-strié obtenue par injection de 6-OH-DA, une rotation de l'animal du côté opposé à la lésion (Ungerstedt 1971 b). Dans ce cas, le nouveau comportement obtenu résulte de l'apparition d'une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques du côté lésé. Ces effets sont d'ailleurs abolis par les neuroleptiques du type butyrophénone ou phénothiazine qui sont des bloquants des récepteurs dopaminergiques.

La lésion bilatérale des systèmes nigro-striés obtenue après des injections de 6-OH-DA faites au niveau des deux substances noires, provoque chez le rat une hypokinésie ainsi qu'une adipsie et une aphagie (Ungerstedt 1971 c). Des résultats identiques sont obtenus après des injections de 6-OH-DA faites dans les aires hypothalamiques latérales qui représentent une zone de passage des fibres nigro

striatales dopaminergiques.

Ces derniers travaux remettent partiellement en cause le rôle joué par les aires hypothalamiques latérales dans la motivation du comportement alimentaire et hydrique. En effet,les perturbations motrices induites par les lésions des aires hypothalamiques latérales peuvent avoir pour origine la lésion des voies dopaminergiques nigro-striatales.

Enfin, Laursen (1963) attribue aux corps striés un rôle dans l'intégration du comportement. Il reste à savoir si l'interruption des afférences dopaminergiques peuvent entraîner un déficit dans la motivation plutôt qu'un déficit moteur.

III . - METABOLISME DE LA DOPAMINE -

L'étude du métabolisme de la DA au niveau des neurones nigro striataux dopaminergiques comprend d'une part celle des mécanismes de sa biosynthèse et d'autre part celle des mécanismes de son inactivation.

A - BIOSYNTHESE DE LA DA -

La DA est synthétisée à partir de la tyrosine qui passe de la circulation sanguine dans les liquides intersticiels et qui est ensuite captée dans les cellules dopaminergiques. La synthèse de la DA dans le noyau caudé a été mise en évidence *in vitro* (Masuoka et coll. 1963) après incubation de coupes de striatum en présence de ^{14}C-tyrosine ainsi qu'*in vivo* (Mac Geer et coll. 1963) après des injections localisées de 3H-tyrosine faites au niveau du noyau caudé chez le chat. Plus récemment, Javoy et coll. (1970) ont mesuré l'accumulation de 3H-DA au niveau du striatum de la substance noire en effectuant des injections localisées de 3H-tyrosine dans le cerveau du rat.

1 - LA PREMIERE ETAPE DE LA BIOSYNTHESE DE LA DA EST L'HYDROXYLATION DE LA L-TYROSINE EN L-DOPA -

Cette réaction enzymatique est catalysée par la tyrosine hydroxylase dont la présence a tout d'abord été décelée dans les tissus noradrénergiques périphériques (Nagatsu et coll. 1964 ; Levitt et coll. 1965) puis au niveau du cerveau (Nagatsu et coll. 1964 ; Mac Geer et coll. 1965). Cette première étape est limitante (Levitt et coll. 1965 ; Udenfriend 1966) ; l'injection de tyrosine ne provoque pas de modifications des taux de CA cérébrales. La tyrosine hydroxylase est spécifiquement localisée dans les neurones catécholaminergiques. En effet, la lésion du système nigro-striatal dopami-

nergique provoque une réduction de la synthèse de ^{14}C-DA à partir de ^{14}C-tyrosine (Goldstein et coll. 1966 ; Fyrö et coll. 1972) ainsi qu'une diminution de 75 à 90 pour-cent de l'activité de la tyrosine hydroxylase (Goldstein et coll. 1969 ; Poirier et coll. 1969 ; Fyrö et coll. 1972).

2 - LA VITESSE DE LA BIOSYNTHESE DE LA DA PAR LA REACTION DE DECARBOXYLATION DE LA DOPA EN DA, CATALYSEE PAR LA DOPA DECARBOXYLASE -

Cette réaction n'est pas limitante, si bien que l'injection intraveineuse de fortes doses de DOPA induit une augmentation du taux des CA cérébrales et principalement de la DA striatale. (Pletscher et Gey 1962 ; Poirier et coll. 1967 b ; Everett et Borcherding 1970). Après une lésion de la voie nigro-striatale l'activité de la DOPA décarboxylase est beaucoup moins diminuée que celle de la tyrosine hydroxylase (Goldstein et coll. 1969). La localisation non spécifique de la décarboxylase située dans les neurones dopaminergiques du noyau caudé, les neurones sérotoninergiques et la paroi des capillaires sanguins (Constantinidis et coll. 1969) expliquent cette différence.

3 - CONTROLE DE LA SYNTHESE -

La première étape de la biosynthèse de la DA est contrôlée par le produit final de la réaction, c'est à dire par les taux de DA. La régulation de l'activité de la tyrosine hydroxylase par les CA a tout d'abord été étudiée *in vitro* sur une préparation enzymatique (Nagatsu et coll. 1964 ; Udenfriend et coll. 1965), puis a été retrouvée *in vivo* au niveau des neurones dopaminergiques en utilisant différentes approches expérimentales (Neff et Costa 1968 ; Javoy et coll. 1972).

Par ailleurs, certaines drogues sont capables d'inhiber spécifiquement l'activité de la tyrosine hydroxylase. C'est notamment le cas des iodo-tyrosine, de l'α méthyl-para-tyrosine (αmpT) qui agissent comme inhibiteurs compétitifs vis à vis de la tyrosine. L'injection de ces drogues provoque une réduction du taux des CA cérébrales (Spector et coll. 1965 ; Corrodi et coll. 1966).

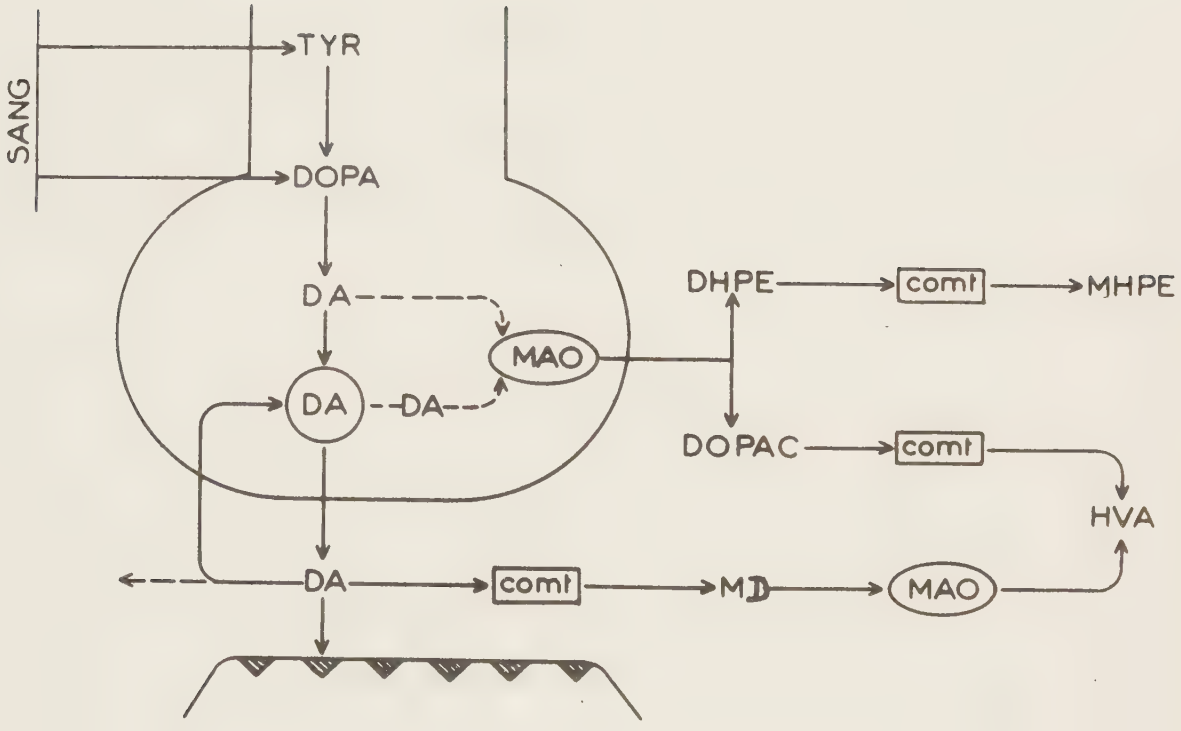


Fig.1 : Métabolisme de la dopamine dans une terminaison dopaminergique centrale.

I - [illegible] -

L'étude [illegible] a permis de mettre en évidence deux mécanismes d'inactivation de la DA : la dégradation enzymatique et la recapture de la DA libérée.

II - [illegible] -

Deux voies principales du catabolisme de la DA ont été mises en évidence : la désamination oxydative et l'O-méthylation (Axelrod 1959).

Les enzymes catalysant ces réactions, la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyl transférase (COMT) sont présentes au niveau du tissu cérébral(Blaschko 1954 ; Axelrod et coll. 1959). La MAO est un enzyme mitochondrial principalement localisé au niveau des terminaisons nerveuses (Rodriguez et de Robertis 1962) ; par contre, la COMT est supposée être un enzyme essentiellement extra-neuronal (Axelrod et coll. 1959). (fig. 1) L'activité de ces enzymes n'est que très peu affectée par la dégénérescence des terminaisons dopaminergiques du striatum (Uretsky et Iversen 1970) ou par des lésions de la substance noire (Marsden et coll. 1972 ; Duncan et coll. 1972). Ces résultats indiquent par conséquent que ces enzymes ne sont pas localisés uniquement au niveau des terminaisons dopaminergiques.

Le métabolisme de la DA a été principalement étudié chez le rat (Milhaud et Glowinski 1962) après injection de ^{3}H-DA dans le liquide céphalo-rachidien. Cette technique a été utilisée afin de circonvenir le problème de la barrière hémato encéphalique. Dans ces conditions, la ^{3}H-DA est captée par les neurones et se comporte ensuite comme la DA endogène.

Glowinski (1967) montre que la ^{3}H-DA est principalement désaminée oxydativement par la MAO. Les métabolites acides formés sont l'acide dihydroxy-phényl acétique (DHPA) et l'acide 3-methoxy-4-hydroxy phenyl acétique ou acide homovanilique (HVA), métabolite principal correspondant au dérivé O-méthylé du DHPA. Les métabolites alcools, dihydroxy phényl éthanol (DHPE) et le 3 methoxy-4-hydroxy-phenyl éthanol (MHPE) sont présents en faibles concentrations. Par ailleurs, la DA est également directement O-méthylée sans subir de

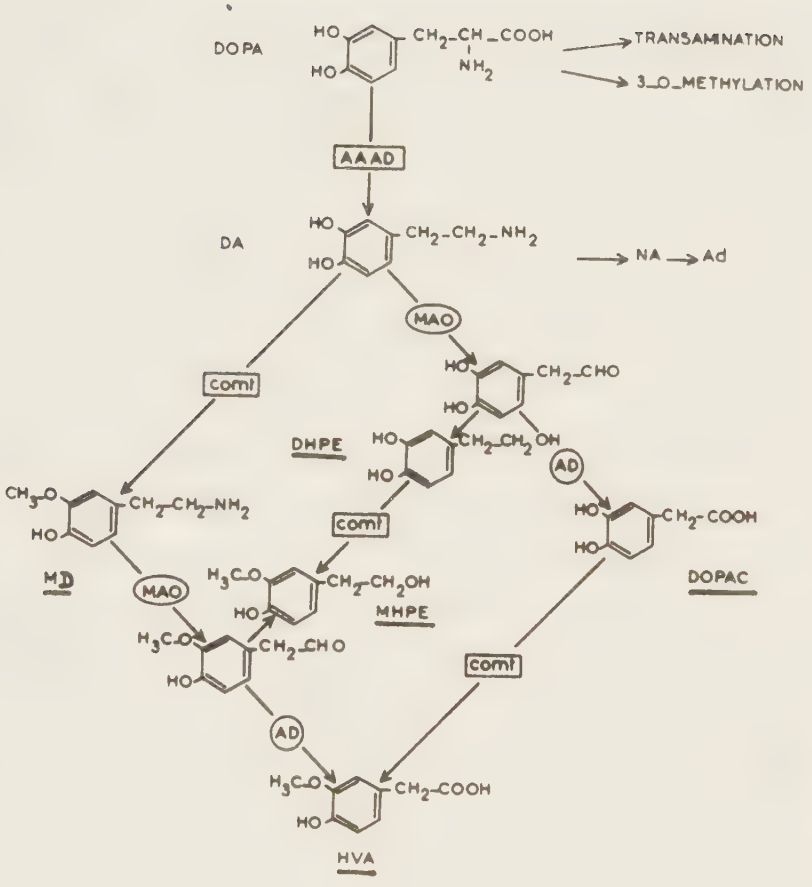


Fig.2 : Métabolites de la Dopamine.

MD = metoxy-dopamine ; DHPE = dihydroxy-phenylethanol ; MHPE = metoxy hydroxy phényl éthanol ; DOPAC = acide dihydroxy phényl acétique ; HVA = acide homovanilique.

désamination oxydative et est ainsi transformée en métoxydopamine (MD). (fig 2)

Les processus de dégradation enzymatiques des CA peuvent être inhibés par différentes drogues. Les inhibiteurs de la monoamino-oxydase comme la pargyline, la phéniprazine, la tranylcypromine entraînent une inhibition irréversible de l'enzyme. Ces drogues provoquent une augmentation des taux des monoamines cérébrales et donc ceux de la DA (Brodie et coll. 1959, Neff et Costa 1966 a, Javoy et coll. 1972).

Les inhibiteurs de la COMT sont peu nombreux (pyrogallol ; tropolone) ; ces substances sont très toxiques et de ce fait peu utilisées.

2 - INACTIVATION DE LA DA PAR RECAPTURE DE L'AMINE -

Une partie importante de la DA libérée extraneuronalement n'est pas métabolisée directement et est recaptée par le neurone.

La capture de la DA par les neurones catécholaminergiques centraux a été mise en évidence *in vivo* après l'injection de ^{3}H-DA dans les ventricules latéraux (Glowinski et Iversen 1966 a). L'amine radioactive se trouve principalement localisée dans les synaptosomes et suit la distribution de la DA endogène (Glowinski et Iversen 1966 b).

Les mécanismes de recapture ont également été étudiés *in vitro* sur des homogénats de striatum ou des préparations synaptosomales (Snyder et Coyle 1969). Coyle et Snyder (1969 a) ont également étudié les effets de plusieurs drogues sur ce processus de transport actif. Ainsi la benzotropine ou cogentine utilisée comme drogue anti parkinsonienne, est un puissant inhibiteur de la recapture de la DA.

TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

La principale difficulté rencontrée dans l'étude de la libération de ^{3}H-DA après marquage des terminaisons dopaminergiques avec de la ^{3}H-tyrosine réside dans la séparation de la ^{3}H-DA libérée en très faibles quantités et de la ^{3}H-tyrosine utilisée comme précurseur en quantités assez importantes. En effet, la ^{3}H-DA libérée ne peut être mesurée que si la contamination par la ^{3}H-tyrosine est inférieure à 1 pour 100 000, ce qui représente une contamination 100 fois moins importante que celle obtenue par les méthodes habituelles de séparation. De même, lorsque la synthèse de la ^{3}H-DA est évaluée par la mesure de l'eau tritiée formée au cours de la transformation de L, 3-5 ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA, la ^{3}H-tyrosine doit être débarassée des produits tritiés formés par radiolyse (^{3}H-DOPA, ^{3}H-H_2O) ; ceux-ci peuvent en effet rendre difficile l'appréciation de la vitesse de réaction de la première étape de la biosynthèse de la DA.

Nous avons par conséquent porté notre effort sur la purification de la ^{3}H-tyrosine et sur la séparation spécifique de la ^{3}H-DA de ses précurseurs et de ses métabolites.

1 - PURIFICATION DE ^{3}H-TYROSINE

La tyrosine utilisée est la L, 3-5 ^{3}H-tyrosine dont l'activité spécifique a varié entre 28,2 Ci/mmole et 56.8 Ci/mmole au cours de nos études. La ^{3}H-tyrosine conservée à 4°C en solution aqueuse contenant 2 % d'éthanol est purifiée très peu de temps avant son utilisation. La solution aqueuse de ^{3}H-tyrosine amenée à un pH voisin de 8 - 8,5 est passée sur deux colonnes successives (0,5 cm de diamètre) contenant chacune 100 mg d'alumine activée selon la méthode d'Anton et Sayre (1962). Le passage de la ^{3}H-tyrosine sur ces deux colonnes permet l'élimination complète des substances ayant une fonction catéchol et notamment celle de la ^{3}H-DOPA. L'effluent de la seconde colonne d'alumine recueilli sur de la glace est ajusté à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique puis passé sur une colonne de résine Dowex AG 50 X 4 (H^+) 200-400 mesh (diamètre 0,5 cm ; hauteur 2,5 cm). La fixation de la ^{3}H-tyrosine sur cette résine permet d'éliminer l'^{3}H-H_2O ainsi que les acides phénoliques contaminant la ^{3}H-tyrosine. La résine Dowex est lavée avec 2ml d'HCl 0,1 N, puis la ^{3}H-tyrosine est finalement éluée. Deux modes d'élution sont utilisés suivant le type d'étude entrepris.

- Dans les études faites in vitro, la ^{3}H-tyrosine est éluée avec 2 ml d'NH_4OH N. L'éluat est ensuite partiellement neutralisé, lyophylisé puis redissout dans de l'eau distillée contenant 2 % d'éthanol. La solution est conservée à 4°C. Avant chaque expérience une quantité déterminée de ^{3}H-tyrosine est prélevée, évaporée à sec et redissoute dans le liquide physiologique utilisé pour l'incubation des tissus.

- Dans les études faites in vivo, la ^{3}H-tyrosine est éluée avec de l'acide chlorhydrique 2N ajoutée par fraction de 1 ml de façon à suivre le pic d'élution de la ^{3}H-tyrosine. Généralement la radioactivité est retrouvée dans le 2e et 3e ml d'élution. Seules les fractions contenant une forte radioactivité sont conservées. Le liquide physiologique est ensuite préparé à partir d'une fraction aliquote de l'éluat acide contenant la ^{3}H-tyrosine. Une quantité déterminée de cette solution acide est prélevée de façon que les quantités de Cl Na formées au cours de la neutralisation de la solution par la soude correspondent exactement à la concentration de Cl Na contenue dans le liquide de perfusion. Les autres sels entrant dans la composition du liquide physiologique ainsi que le glucose sont ensuite ajoutés à la solution, qui est finalement amenée à pH 7.3 en faisant barbotter un mélange de carbogène (O_2- CO_2 95/5) pendant 10 minutes.

2 - SEPARATION DE LA ^{3}H-DA -

La ^{3}H-DA est tout d'abord isolée de ses précurseurs et de ses métabolites acides par fixation sur une résine échangeuse d'ions (cationique faible) retenant les amines puis séparée des amines dépourvues de fonction catéchol par adsorption sur alumine.

a - Fixation de la ^{3}H-DA sur une colonne d'amberlite.

Les échantillons à analyser conservés en solution alcoolique (éthanol-eau 3 : 1 v/v) sont ajustés à pH 6.9, puis centrifugés. Au surnageant alcoolique est ajouté un volume égal d'eau distillée, puis chaque échantillon est passé sur une colonne d'amberlite CG 50 (H^+) (diamètre 0,5 cm, hauteur 2,5 cm) purifiée activée et tamponnée à pH 6.1 avec une solution de NaH_2Po_4/K_2HPo_4 (0 , 2M). Après passage de la solution alcoolique, la colonne est lavée avec 5 ml d'eau distil-

lée, puis les amines fixées sur la résine sont éluées avec 5 ml d'acide acétique 0,2 M. L'éluat est recueilli dans des tubes à essai contenant 0,5 ml d'une solution stabilisatrice antioxydante (EDTA2% $Na_2S_2O_5$ 1 %) et 1 µg de DA ajouté comme entraineur. Le rendement de cette opération est de 90 % pour des volumes de liquide physiologique de l'ordre de 1,5 ml. La résine utilisée étant sensible à la concentration en sels, il est nécessaire d'augmenter la hauteur de la colonne si les échantillons à analyser contiennent un volume de liquide physiologique supérieur à 1,5ml.

b - Adsorption de la ^{3}H-DA sur une colonne d'alumine.

Les éluats acétiques de la résine d'amberlite, ajustés à pH 8.4 avec de l'ammoniaque 0,2 M sont immédiatement passés sur une colonne de 0,5 cm de diamètre contenant 100 mg d'alumine activée, tamponée avec de l'acétate de sodium (0,2 M - pH 8.4). L'alumine est ensuite lavée successivement avec 5ml d'acétate de sodium (0,2 M pH 8.4) et 5 ml d'eau distillée. La ^{3}H-DA est finalement éluée de l'alumine avec 1 ml d'HCl 0,2 N. L'éluat est recueilli directement dans une fiole de comptage de radioactivité. La mesure de la radioactivité est effectuée en ajoutant 10 ml d'instagel$^{(R)}$ ou 14 ml d'une solution scintillante Triton-toluène/POPOP-PPO-toluène. Dans toutes ces analyses, la contamination due à la ^{3}H-tyrosine est évaluée en ajoutant à des échantillons non radioactifs une quantité de ^{3}H-tyrosine égale à celle contenue dans les échantillons à analyser. Les quantités de radioactivité retrouvées dans ces conditions à la fin de l'analyse correspondent à des valeurs de blancs qui sont systématiquement retranchées de la radioactivité trouvée pour chaque échantillon.

Tous les résultats sont ensuite corrigés d'un facteur faisant intervenir d'une part le rendement global de toutes les étapes de l'analyse, évalué grâce à des standards internes de ^{3}H-DA, et d'autre part l'efficacité de comptage obtenue avec un standard interne de ^{3}H-toluène d'activité connue. Généralement le rendement de l'analyse biochimique obtenu au cours de la séparation de ^{3}H-DA est de 70 à 80%.

3 - IDENTIFICATION DE LA ^{3}H-DA PAR COCHROMATOGRAPHIE

L'identification des ^{3}H-CA contenues dans l'éluat de la co-

lonne d'alumine est obtenue après acétylation des groupements hydroxylés des CA par l'anhydride acétique et cochromatographie descendante sur papier des dérivés acétylés formés, selon la méthode de Laverty et Sharman (1965 a).

Les quantités de ^{3}H-CA accumulées dans les tissus étant importantes, l'identification de la ^{3}H-DA peut se faire sur un échantillon provenant d'un seul noyau caudé. Par contre, pour vérifier l'identité de la ^{3}H-DA contenue dans les superfusats au cours des expériences in vivo et in vitro, plusieurs fractions de superfusats sont rassemblées afin de réaliser une chromatographie correcte. Dans ce cas, chaque échantillon est d'abord passé sur une colonne d'amberlite, les éluats sont ensuite rassemblés par 2 ou par 3, puis ajustés à pH 8,4 et finalement passés sur une colonne d'alumine. Les éluats de la colonne d'alumine, recueillis en présence d'EDTA (0,2 ml d'une solution à 1 %) et d'acide ascorbique (0,2 ml d'une solution à 0,5 %), sont rassemblés, ajustés à pH 4 avec de la soude, puis mis en présence de 0,5 ml d'anhydride acétique. La solution obtenue est progressivement neutralisée par addition de bicarbonate de sodium en poudre, jusqu'à cessation du dégagement de CO_2.

Les dérivés acétylés sont ensuite extraits par 10 ml de dichlorométhane. L'extraction peut être répétée une seconde fois. La phase organique contenant les dérivés acétylés est passée sur une colonne de sulfate de sodium anhydre, puis évaporée à 40-50 °C sous vide. Le résidu est repris par 500 µl de dichlorométhane, et l'extrait est déposé sur du papier Wathman (alcali-washed n° 50) coupé en bandes de 2 cm de large de façon à réaliser une chromatographie descendante.

Le solvant utilisé pour la chromatographie est un mélange de toluène, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau distillée (10 : 4 : 5 : 5 v/v). L'atmosphère de la cuve ainsi que le papier de chromatographie sont équilibrés avec la phase aqueuse de solvant pendant 16 h à 26°C puis la phase organique (solvant de migration) est ajoutée afin d'effectuer la chromatographie des dérivés acétylés.

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a migré de 30 à 40 cm ; les tâches d'acetyl DA et d'acétyl NA étant parfaitement séparées dans ces conditions. La ^{3}H-tyrosine qui peut éventuellement contaminée l'éluat de l'alumine, migre au niveau du front

du solvant.

Un mélange d'éthylène diamine, d'HCl 2N et d'eau (3 : 2 : 20 v/v) est pulvérisé sur des bandes de chromatographie, qui sont ensuite placées entre 2 plaques de verre et chauffées à 80 °C pendant 20 minutes afin de révéler les tâches d'acétyl DA et d'acétyl NA. L'analyse des pics de radioactivité est obtenue soit directement en utilisant un lecteur de radiochromatogramme soit en mesurant la radioactivité contenue dans chaque cm successif du chromatogramme après élution des dérivés acétylés avec 0,5 ml de dichlorométhane. La radioactivité est déterminée après addition de 10 ml du mélange scintillant (toluène-POPOP-PPO).

La séparation de l'acétyl DA et de l'acétyl NA obtenue dans ces conditions est indiquée dans la figure 4.

4 - DOSAGE SPECTROFLUORIMETRIQUE DE LA DA ET DE LA TYROSINE -

a - Dosage de la DA.

La DA endogène est dosée selon la technique de Laverty et Taylor (1968). Dans cette méthode la DA est transformée en dérivé fluorescent par l'iode. La réaction d'oxydation est arrêtée par addition d'un réducteur en milieu alcalin, ce qui entraîne un réarrangement de la molécule dont la fluorescence est maximale en milieu acide.

Une prise aliquote (0,5 ml) de l'éluat acétique de la résine d'amberlite est placée dans un tube à hémolyse, puis ajustée à pH 7 avec 0,5 ml d'un tampon phosphate (tampon NaH_2PO_4/K_2HPO_4 ; pH 7 ; 0.2 M ; contenant 6 g ‰ de Na OH). A chaque échantillon ainsi tamponé sont successivement ajoutés 50 µl d'une solution d'iode 0,02 N dans NAI à 5 % puis 3 minutes après, 250 µl de sulfite alcalin (Na_2SO_3 1,25 % ; Na_2EDTA 1 % dans NaOH 2,5N) et enfin 5 minutes plus tard, 100 µl d'acide acétique concentré. Les tubes sont ensuite placés dans un bain marie à 90°C pendant 40 minutes. La fluorescence des échantillons déterminée au spectrofluorimètre (excitation 320 mµ ; émission 375 mµ) est stable pendant au moins une heure. La valeur de la fluorescence non spécifique due aux réactifs est déterminée sur des éluats acétiques en ajoutant les réactifs dans l'ordre inverse. Le rendement des analyses est obtenu grâce à un standard interne de

DA ajouté en quantité connue.

b - Dosage de la tyrosine.

La tyrosine contenue dans l'effluent de la résine amberlite est séparée des métabolites désaminés de la DA par fixation sur une résine Dowex H^+.

Les effluents de la résine amberlite sont ajustés à pH 2, mis au congélateur pendant 2 heures, centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 15000 tours/min, puis passés sur une résine Dowex AG50X4 (H^+) (0,5 cm de diamètre ; 2,5 cm de hauteur). La résine est lavée avec 2 ml d'HCl 0,1 N puis l'élution de la tyrosine est réalisée par addition de 2 ml de NH_4OH N -

La tyrosine est ensuite dosée selon la méthode de Udenfriend (1962). Une partie aliquote de l'éluat ammoniacal de la résine Dowex (0,5 ml) est ajustée à pH 1 avec 50 µl d'acide $HClO_4$ concentré. Ensuite 0,5 ml d'une solution alcoolique de nitroso 2 naphtol à 0,1 et 0,5 ml d'une solution préparée extemporanément (49 volumes de HNO_3 dilué 5 fois et 7 volumes d'une solution aqueuse de $NaNo_2$ à 2,5 %) sont ajoutés aux échantillons. Ceux-ci sont agités et placés pendant 30 minutes dans un bain marie maintenu à 55°C.

Les échantillons sont ensuite refroidis et 5 ml de chlorure de méthylène sont versés. Après une agitation de 5 minutes, puis une centrifugation la phase aqueuse contenant le dérivé fluorescent de la tyrosine est prélevée. La fluorescence est lue au spectrofluorimètre (excitation = 460 mµ ; émission=570 mµ) . Les résultats sont corrigés de la valeur du blanc (fluorescence non spécifique des réactifs) et du rendement de l'analyse obtenu grâce à un standard interne.

5 - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA TYROSINE HYDROXYLASE -

a - Préparation de la tyrosine hydroxylase.

La tyrosine hydroxylase est partiellement purifiée, selon le protocole décrit par Musacchio et coll. (1969) légèrement modifié. Les différentes étapes de la purification se font à 4°C. Les tissus congelés sont homogénéisés avec un appareil Polytron, pendant 15sec, dans 5 ml de tampon Tris HCl (0,005 M - pH 7,0) contenus dans des tubes en polycarbonate. Les homogénats sont centrifugés à 100 000 g

pendant 1 heure. Les surnageants sont transferrés dans des tubes à centrifuger en polyéthylène et 5 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (pH 7) sont ajoutés et mélangés avec précaution. Après une période d'équilibration de 20 min , le mélange est centrifugé à 10 000 g pendant 20 min. Le surnageant est jeté, et le précipité est dissout dans 1 ml de tampon Tris HCl utilisé pour l'homogénéisation. L'activité de la tyrosine hydroxylase est déterminée sur une partie aliquote de 0,5 ml.

b - Mesure de l'activité de la tyrosine hydroxylase.

L'activité de l'enzyme est déterminée selon la méthode légèrement modifiée, décrite par Nagatsu et coll. (1964 a) en mesurant l'^{3}H-H_2O formée lors de l'hydroxylation de la L, 3-5 ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA. Les tubes d'incubation étant gardés dans la glace, les composés suivants sont ajoutés : 0,5 ml de l'extrait enzymatique, 0,2 ml d'acétate de sodium (M, pH : 5,9), 0,1 ml de sulfate d'ammonium ferreux (0,005 M). Après l'addition de 0,1 ml de cofacteur : 6,7 diméthyl, 5,6,7,8 tétrahydroptérine ($DMPH_4$ = 0,01 M) dissout dans une solution molaire de 2 mercaptoéthanol, les échantillons sont préincubés pendant 4 minutes à 37°C. Ensuite, 100 mmoles de L,3-5 ^{3}H-tyrosine (10 mC/mmole) dissoute dans 0,1 ml d'eau distillée, sont ajoutées et la réaction se poursuit pendant 10 min à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 0,1 ml d'$HClO_4$ (HN). Le volume des échantillons est ajusté à 2 ml avec de l'eau distillée. L'^{3}H-H_2O contenue dans les échantillons est séparée de la ^{3}H-tyrosine par distillation du liquide de la réaction (voir les techniques décrites au chapitre II) à 37°C sous pression réduite. L'^{3}H-H_2O est mesurée sur une fraction aliquote du distillat (0,2 ml).

PREMIERE PARTIE

ETUDES DE LA LIBERATION ET DE LA SYNTHESE DE LA ^{3}H-DA "IN VITRO"

CHAPITRE I

LIBERATION DE LA ^{3}H-DA PREALABLEMENT SYNTHETISEE A PARTIR DE ^{3}H-TYROSINE PAR SUPERFUSION DU STRIATUM ISOLE DU RAT -

La libération de la DA au niveau du noyau caudé a été mise en évidence in vivo chez le chat dans quelques cas seulement et dans des conditions pharmacologiques très particulières. Dans ces études la DA libérée a été dosée en utilisant les méthodes spectrofluorimétriques habituelles. Mac Lennan (1964) observe la libération spontanée de la DA en perfusant une petite région du noyau caudé avec une "push-pull" canule. Cependant Mac Kenzie et Szerb (1968) utilisant à nouveau cette approche expérimentale ne peuvent mesurer la libération spontanée de la DA. Ils observent uniquement la libération de la DA lorsque de très fortes concentrations d'amphétamine sont ajoutées au liquide de superfusion. Portig et coll. (1968) étudient la libération de la DA en perfusant le ventricule latéral chez le chat. Dans ces conditions la libération de la DA est induite pharmacologiquement par superfusion locale de d-tubocurarine. Cependant, même avec cette approche expérimentale où une surface importante du noyau caudé est superfusée, la libération spontanée de la DA est très difficilement mesurable. Les techniques spectrofluorimétriques apparaissent en fait trop peu sensibles pour mesurer la libération spontanée de la DA pendant des fractions de temps relativement courtes. C'est pourquoi il nous a paru nécessaire d'utiliser des techniques radioactives pour étudier la libération de la DA de façon à augmenter la sensibilité et les limites de détection de cette amine. La libération de la DA a d'abord été étudiée in vitro par perfusion du striatum isolé du rat. Cette approche est d'une part commode pour mettre au point la méthode de marquage utilisée, puisqu'elle permet de travailler sur un grand nombre d'échantillons. Par ailleurs, cette nouvelle méthode expérimentale permet d'établir, plus facilement que dans une étude in vivo les relations entre les quantités de DA libérée et celles contenues dans les tissus.

Le marquage des terminaisons dopaminergiques peut être réalisé par deux approches différentes. L'une d'elles consiste à marquer les terminaisons avec de la ^{3}H-DA exogène. Cette technique de marquage a été utilisée par Baldessarini et Kopin (1966 - 1967) pour mettre en évidence et étudier au niveau de coupes de cerveau les effets de certains ions ou de drogues psychotropes sur les libérations de ^{3}H-NA et de ^{3}H-DA induites par application d'un champ électrique. Cette méthode valable dans certaines conditions peut cependant manquer de spécificité si par exemple la ^{3}H-DA ajoutée à des concentrations assez élevées n'est pas captée uniquement par les terminaisons dopaminergiques mais également par des terminaisons noradrénergiques ou sérotoninergiques présentes au niveau du striatum.

La deuxième approche possible consiste à marquer les terminaisons dopaminergiques du striatum avec de la tyrosine radioactive. La ^{3}H-tyrosine captée par les tissus est transformée spécifiquement en ^{3}H-DA aux niveaux des terminaisons dopaminergiques où sont localisés les enzymes intervenant dans la biosynthèse de la DA. Cette méthode est, dans une certaine mesure, très difficile à réaliser puisqu'elle nécessite l'utilisation de fortes quantités de ^{3}H-tyrosine, afin de pouvoir détecter la libération de quantités mesurables de ^{3}H-DA. Il est donc nécessaire d'avoir une technique de séparation de la ^{3}H-DA et de la ^{3}H-tyrosine très sélective pour mesurer précisément la ^{3}H-DA contenue dans les liquides de superfusion. Cette méthode de marquage spécifique a été développée et adaptée à un modèle expérimental qui nous a permis d'étudier in vitro la libération de la ^{3}H-DA et les relations entre l'accumulation et la libération du médiateur radioactif.

Dans cette étude nous exposons tout d'abord les techniques utilisées, puis nous vérifions qu'il est possible dans nos conditions expérimentales de mesurer spécifiquement la libération de la ^{3}H-DA.

Ensuite nous analysons les modifications de libération qui sont induites 1) de façon non spécifique en dépolarisant les terminaisons nerveuses ;

2) spécifiquement en utilisant, des drogues psychotro-

pes qui affectent le métabolisme des CA cérébrales, ou des substances qui jouent vraisemblablement un rôle de médiateur chimique au niveau du striatum.

I - TECHNIQUE DE SUPERFUSION DU STRIATUM CHEZ LE RAT.

Les rats (Charles River - 200-250 g) sont tués par décapitation. Le cerveau est immédiatement prélevé, le striatum est disséqué à 4°C à l'aide de petits manipulateurs de verre. Le poids moyen d'un striatum de rat est de l'ordre de 50 mg. Le striatum est ensuite incubé pendant 30 minutes, dans 16 µCi de ^{3}H-tyrosine, et sous une atmosphère d'O_2-CO_2 (95 : 5).

A la fin de l'incubation, le striatum est lavé dans 5 ml de liquide physiologique de façon à éliminer la ^{3}H-tyrosine absorbée sur la surface du noyau caudé et contenue dans les espaces extracellulaires.

Le striatum est ensuite placé dans une chambre de superfusion maintenue à 37°C (le volume de liquide entourant la structure est de l'ordre de 100 µl), puis superfusé en continu avec un liquide physiologique ne contenant pas de ^{3}H-tyrosine. Le liquide physiologique perfusé à vitesse constante (6 ml/h) à l'aide d'une pompe Braun (fig 3) est continuellement oxygéné avec le mélange O_2-CO_2. Les superfusats sont collectés par fraction de 15 minutes en aspirant par le vide le liquide arrivant au niveau d'un catheter placé au dessus du striatum. Les superfusats sont recueillis à 0°C en présence de 4,5 ml d'alcool absolu contenant 0,2 ml de la solution stabilisatrice. A la fin de la perfusion les tissus sont homogénéisés dans 5 ml d'éthanol eau (3 : 1 v/v). Les superfusats ainsi que les homogénats de tissus sont conservés à -17°C jusqu'à l'analyse biochimique permettant de mesurer leur contenu en ^{3}H-DA et en ^{3}H-tyrosine.

Les effets de drogues ou de certains ions, sur la libération de ^{3}H-DA, ont été testés en ajoutant ces substances au liquide de superfusion.

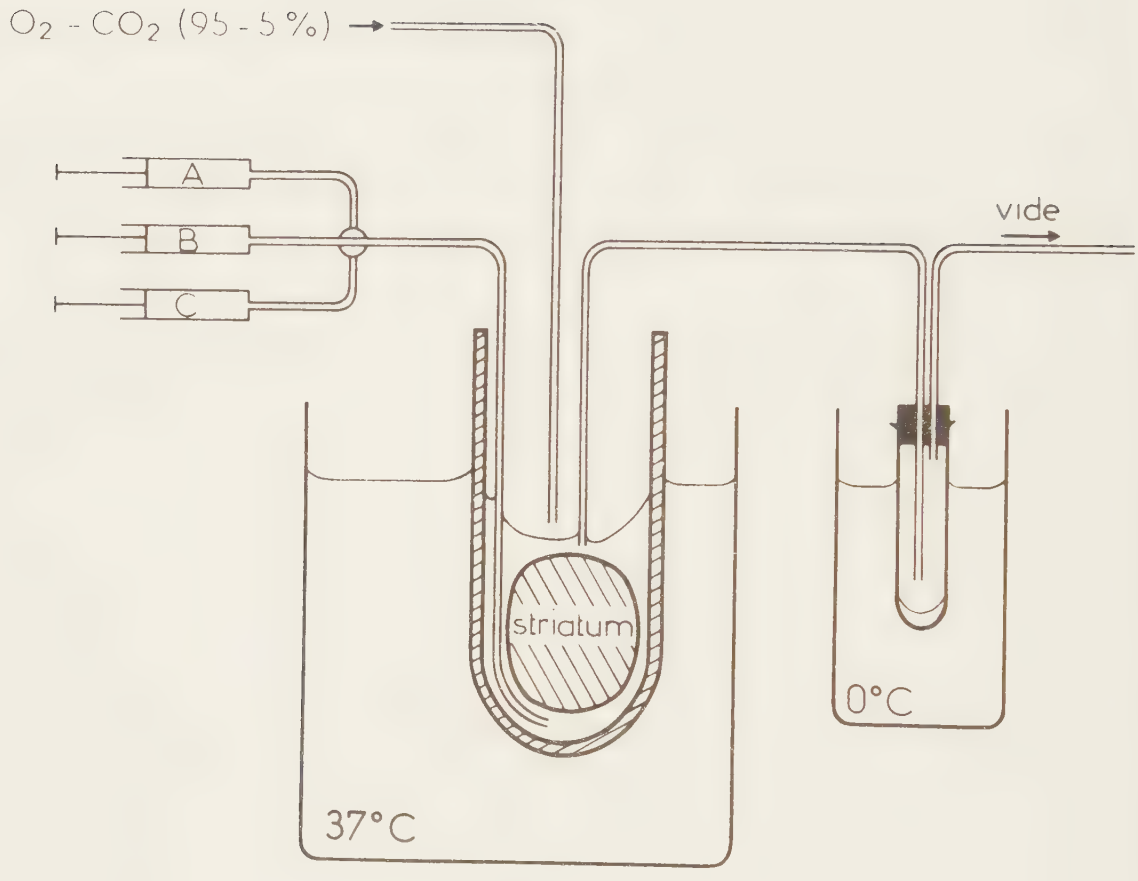


Fig.3 : Schéma du dispositif de superfusion du néostriatum isolé.

II - LIBERATION SPONTANEE DE ^{3}H-DA

1 - Identification de l'amine libérée.

Utilisant la technique de superfusion, il est possible de mettre en évidence la libération spontanée de ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine au niveau des terminaisons dopaminergiques du striatum. Les quantités d'amines libérées sont détectables pendant une période de temps d'environ 2 heures après la fin de l'incubation. L'amine radioactive libérée est identifiée après acétylation des amines contenues dans l'éluat de la colonne d'alumine, et co-chromatographie sur papier des dérivés acétylés. Les contenus en amine de la première fraction ainsi que des fractions collectées pendant les 45 minutes suivantes sont identifiés en rassemblant les fractions obtenues au cours de plusieurs expériences de superfusion.

L'analyse de la radioactivité des chromatogrammes révèle l'existence d'un seul pic radioactif correspondant au pic d'acétyl dopamine (fig. 4).

2 - Analyse de l'histogramme des quantités de ^{3}H-DA libérées.

Comme l'indique l'histogramme de la figure 5 les quantités de ^{3}H-DA recueillies pendant les 45 premières minutes de superfusion diminuent rapidement alors que cette décroissance est beaucoup plus lente pendant les 90 minutes suivantes.

Les demies-vies de disparition de la ^{3}H-DA dans chacune des 2 parties de l'histogramme sont respectivement 10 minutes et 45 minutes.

3 - Etude des caractéristiques de diffusion des substances contenues dans les liquides extracellulaires.

Les striata sont incubés en présence de ^{14}C urée ou d'^{3}H-inu-

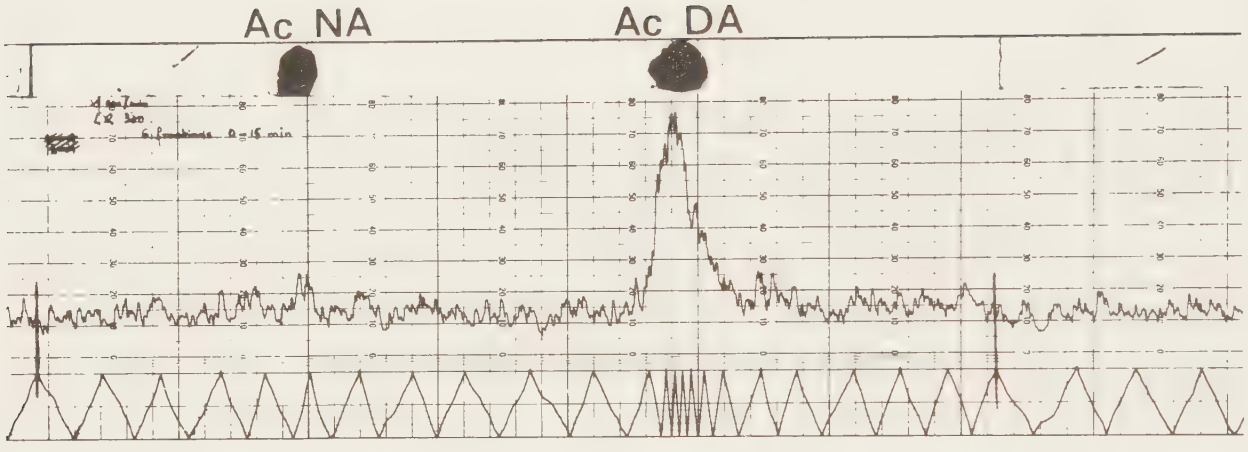


Fig. 4 : Identification de la ^{3}H-DA libérée dans le liquide de superfusion : Les striata sont incubés en présence de ^{3}H-tyrosine (16 µCi), puis superfusés avec un liquide physiologique convenablement oxygéné. Les superfusats sont collectés pendant une heure par fraction de 15 min., puis analysés. Les éluats de l'alumine sont rassemblés, et les ^{3}H-CA sont acétylées et cochromatographiées. Le radiochromatogramme présente un seul pic radioactif correspondant à l'^{3}H-acétyl-DA.

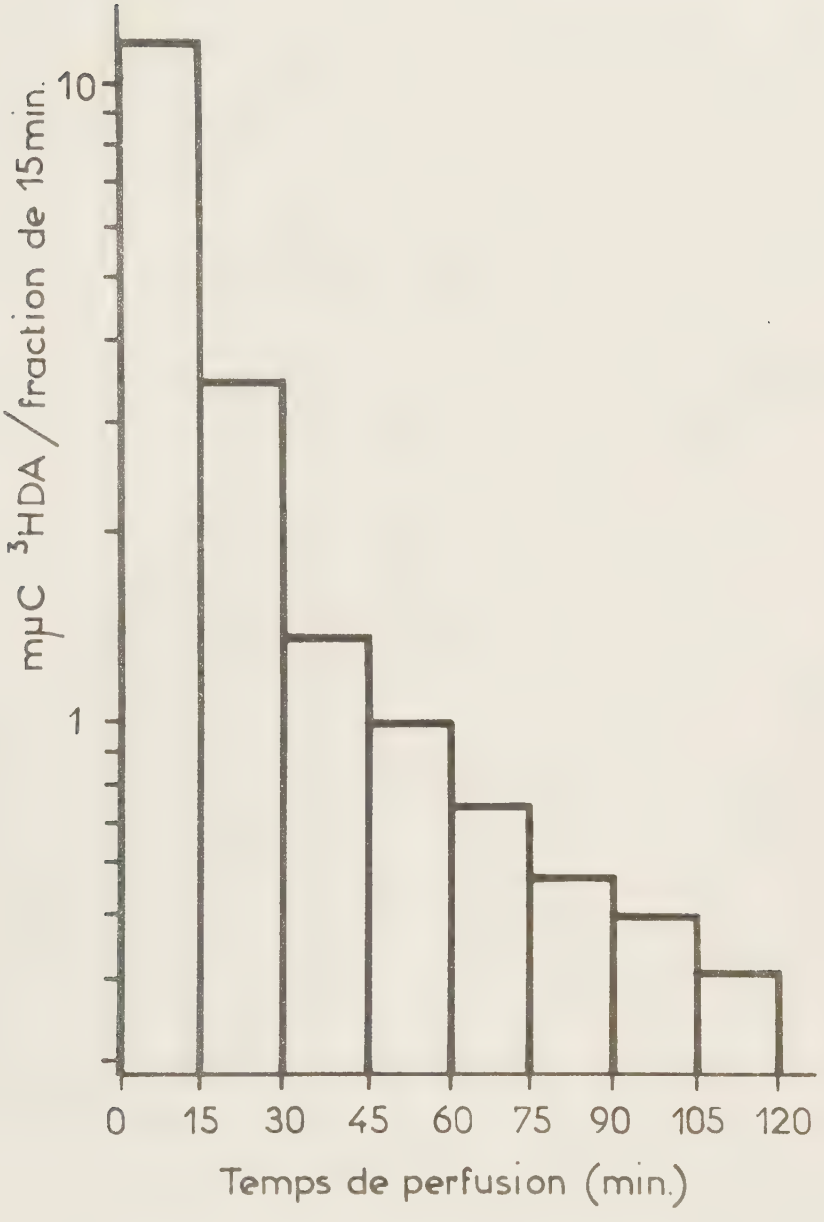


Fig.5 : Histogramme des quantités de ^{3}H-DA libérées dans les superfusats en fonction du temps de superfusion. Le néostriatum est incubé en présence de ^{3}H-tyrosine (16 μCi), puis superfusé avec un liquide physiologique. Les superfusats sont collectés par fraction de 15 min. et analysés afin de déterminer leur contenu en ^{3}H-DA.

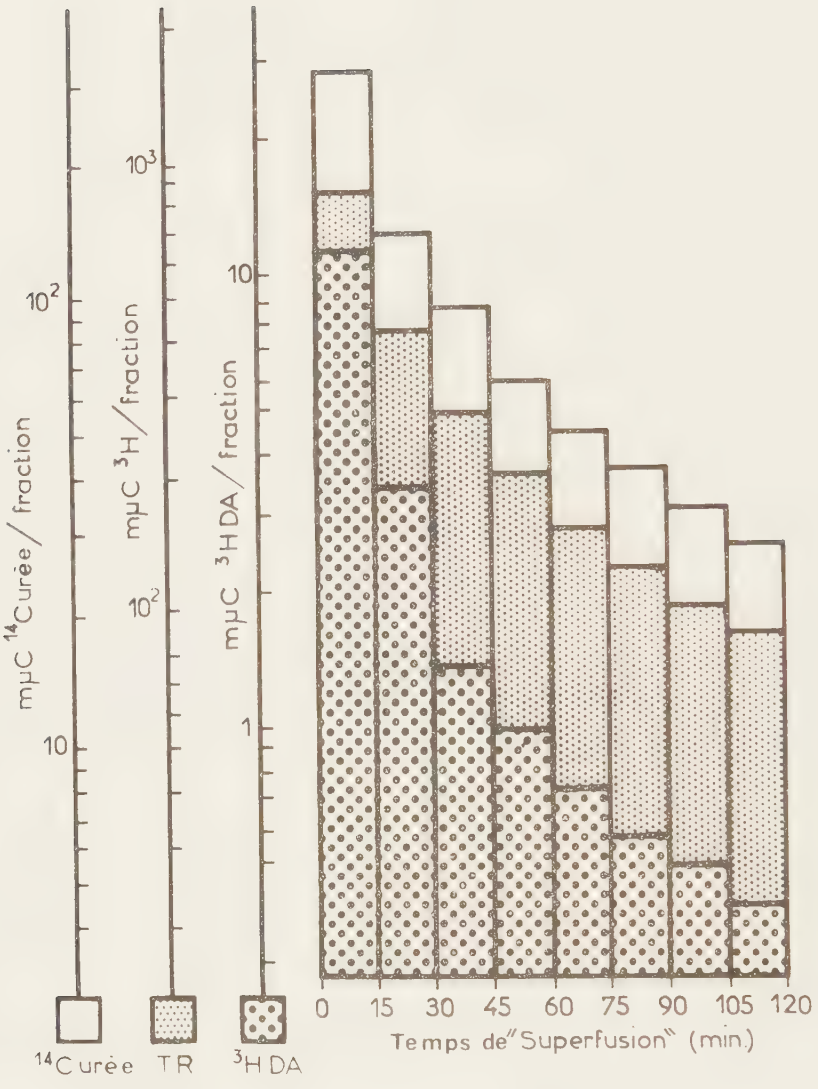


Fig.6 : Libération spontanée de la ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine. Comparaison avec des courbes de diffusion de la ^{3}H-tyrosine ou de l'^{14}C-urée. Les quantités de ^{3}H-DA libérées ainsi que les quantités totales de ^{3}H retrouvées dans les superfusats après avoir incubé le néostriatum en présence de ^{3}H-tyrosine sont représentées dans cet histogramme. La diffusion du ^{14}C obtenue après incubation du néostriatum en présence de ^{14}C urée (2,8 μCi) est également indiquée.

line pendant 30 min. Après un lavage dans 5 ml de liquide physiologique, les tissus sont superfusés pendant 2 heures. Les courbes de ces deux substances sont différentes des courbes de libération de la ^{3}H-DA. En effet dans la partie initiale de la courbe, la 1/2 vie de diffusion de ces substances est de 20 min. Il en est de même pour la diffusion de la ^{3}H-tyrosine (fig.6) qui doit également provenir en grande partie des liquides extracellulaires.

4 - Analyse en fonction du temps de superfusion des quantités de ^{3}H-DA libérées par rapport à celles présentes dans les tissus.

La radioactivité totale ainsi que le contenu en ^{3}H-CA des striata isolés sont déterminés à la fin de l'incubation et après différents temps de superfusion. L'analyse par chromatographie des ^{3}H-CA contenues dans les tissus après 1 heure et 3 heures de superfusion révèle la présence prédominante de ^{3}H-DA. Les très faibles quantités de ^{3}H-NA formées sont à peine détectables et représentent environ 1/60 des quantités totales de ^{3}H-DA. Par ailleurs, les quantités de ^{3}H-DA contenues dans les tissus augmentent pendant la première heure de superfusion (fig. 7). Par conséquent la ^{3}H-DA est encore synthétisée à partir de la ^{3}H-tyrosine présente dans les tissus, pendant cette période de la superfusion. Par contre, pendant les 3 heures suivantes les taux de ^{3}H-DA décroissent exponentiellement avec une 1/2 vie de disparition de l'ordre de 1 heure. De ce fait, les taux de ^{3}H-DA accumulés dans les tissus sont à peu près identiques immédiatement après l'incubation ou 2 heures après le début de la superfusion. C'est pourquoi ces 2 temps ont été choisis pour déterminer les proportions relatives des quantités de ^{3}H-DA libérées et accumulées dans les tissus (table 1). Les quantités de ^{3}H-DA recueillies pendant la première fraction de 15 min représentent 10 % de celles contenues dans les tissus alors que ce taux est de 0,7 % après deux heures de superfusion.

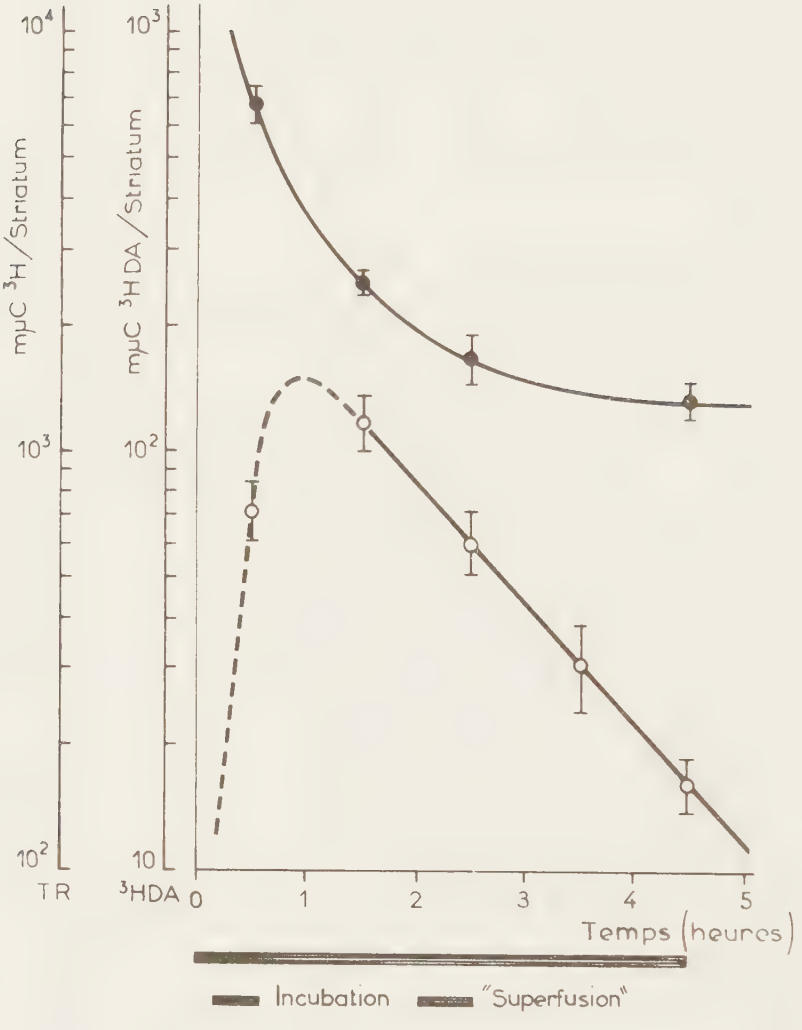


Fig.7 : Formation et utilisation de la ^{3}H-DA au niveau des striata. Les striata isolés sont incubés avec de la ^{3}H-tyrosine (16 μCi) pendant 30 min., puis superfusés. La ^{3}H-DA (points blancs) et la radioactivité totale (points noirs) sont mesurés à la fin de l'incubation et à différents temps après le début de la superfusion. Chaque valeur est la moyenne de 4 déterminations correspondant à 4 striata ± l'erreur standard. La ligne en pointillé correspond à une période où la ^{3}H-DA est synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine.

^{3}H DA tissu (mμC/striatum)	0 min	120 min
	70	60
^{3}H DA perfusat (mμC/15' perfusion)	0-15 min	105-120 min
	10	0.4
(%) $\frac{^3\text{H DA perfusat}}{^3\text{H DA tissu}}$	14.3	0.7

Table 1 : Rapport des quantités de ^{3}H-DA libérées dans les superfusats et accumulées dans les tissus. Les striata sont incubés en présence de ^{3}H-tyrosine (16 μCi) pendant 30 min., puis superfusés. Le rapport des quantités de ^{3}H-DA libérées pendant les 15 premières minutes de superfusion et accumulées dans les tissus à la fin de l'incubation est déterminé. Le rapport de quantités de ^{3}H-DA libérées entre la 105ème et 120ème min de superfusion et des quantités de ^{3}H-DA accumulées dans les tissus après 2 heures de superfusion est également calculé.

III - LIBERATION INDUITE DE ^{3}H-DA

1 - Effets provoqués par les dépolarisations non spécifiques.

Après 60 min de superfusion le liquide de superfusion est enrichi en KCl afin d'obtenir une concentration finale en ions K^+ égale à 20 mM. L'excès d'ions K^+ augmente la libération de ^{3}H-DA de deux fois par rapport à la fraction précédent le traitement (fig. 8)

Par ailleurs la libération induite par les ions K^+ est fortement potentialisée lorsque le 2-4 dinitrophénol, un découplant des phosphorylations oxydatives, est ajouté au liquide de superfusion. Cette substance (10^{-4}M) ajoutée en même temps que les ions K^+ provoque une augmentation de libération 10 fois plus importante que celle détectée uniquement après addition des ions K^+ (fig. 8).

D'autre part, la dépolarisation des terminaisons dopaminergiques est également obtenue en utilisant un champ électrique appliqué répétitivement (10c/sec) pendant des durées de 0,5 msec. L'application d'un champ électrique d'intensité relativement faible (5v/cm) ne permet pas de déceler des variations de libération de ^{3}H-DA. Par contre la dépolarisation induite par un champ électrique d'intensité plus forte (25v/cm) augmente la libération de la ^{3}H-DA (fig. 9). De plus après arrêt de la stimulation, le niveau de libération de ^{3}H-DA reste généralement supérieur au niveau de base moyen déterminé d'après les courbes de libération spontanée de ^{3}H-DA. Cet effet n'est par contre jamais observé après une application d'ions K^+.

2 - Effet de la d-amphétamine et de la β-phénylisopropylhydrazine (Catron$^{(R)}$) .

Il a été démontré que l'amphétamine agit au niveau des neurones catécholaminergiques centraux en activant la vitesse de disparition des ^{3}H-CA exogènes préalablement captées par les neurones (Glowinski et coll. 1966 a et c). Au contraire, le Catron$^{(R)}$ un in-

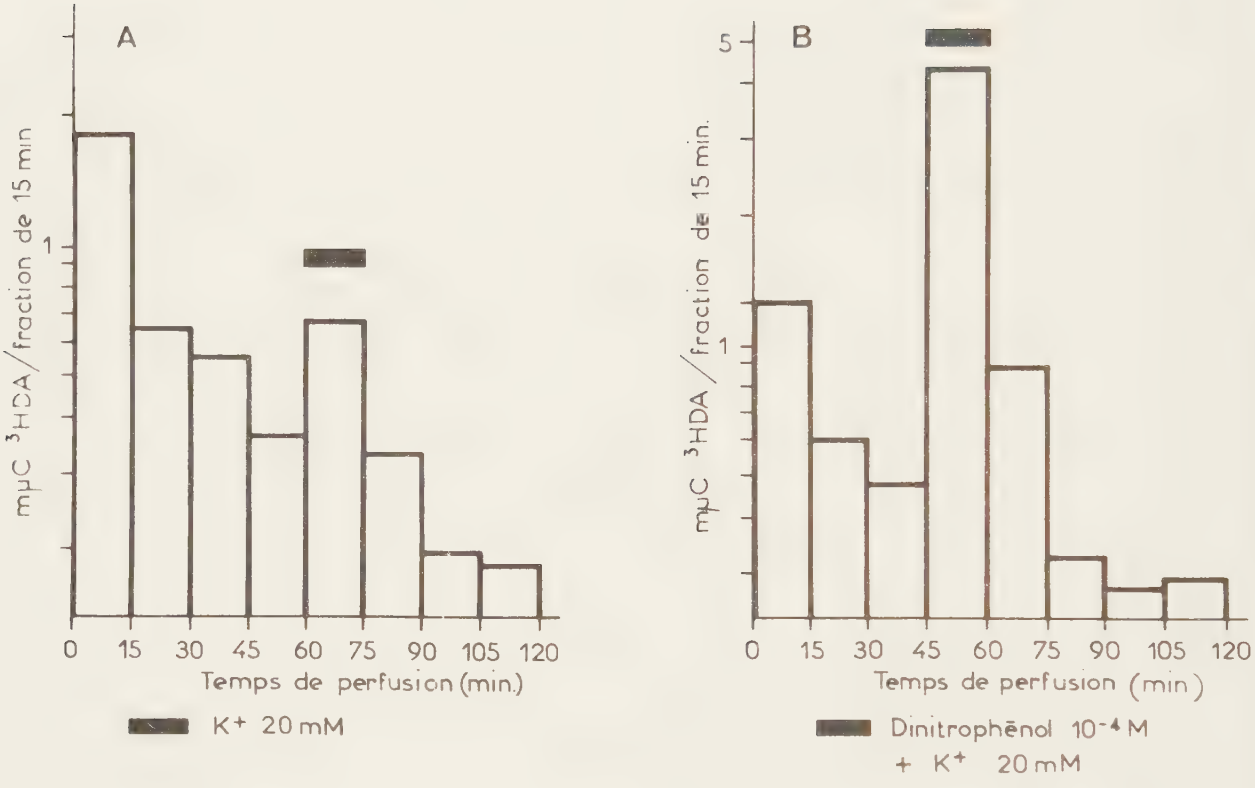


Fig.8 : Effet d'un excés d'ions K^+ sur la libération de la ^{3}H-DA. Les striata sont incubés en présence de ^{3}H-tyrosine, puis superfusés. Fig.8_A , un excés d'ions K^+ (20 mM) est ajouté au liquide physiologique pendant la $5^{ème}$ fraction de superfusion. Fig.8_B , un excés d'ions K^+ (20 mM) en présence de dinitrophénol (10^{-4}M) est ajouté au liquide de superfusion pendant la $4^{ème}$ fraction collectée. Les quantités de ^{3}H-DA libérées sont mesurées dans les fractions successives.

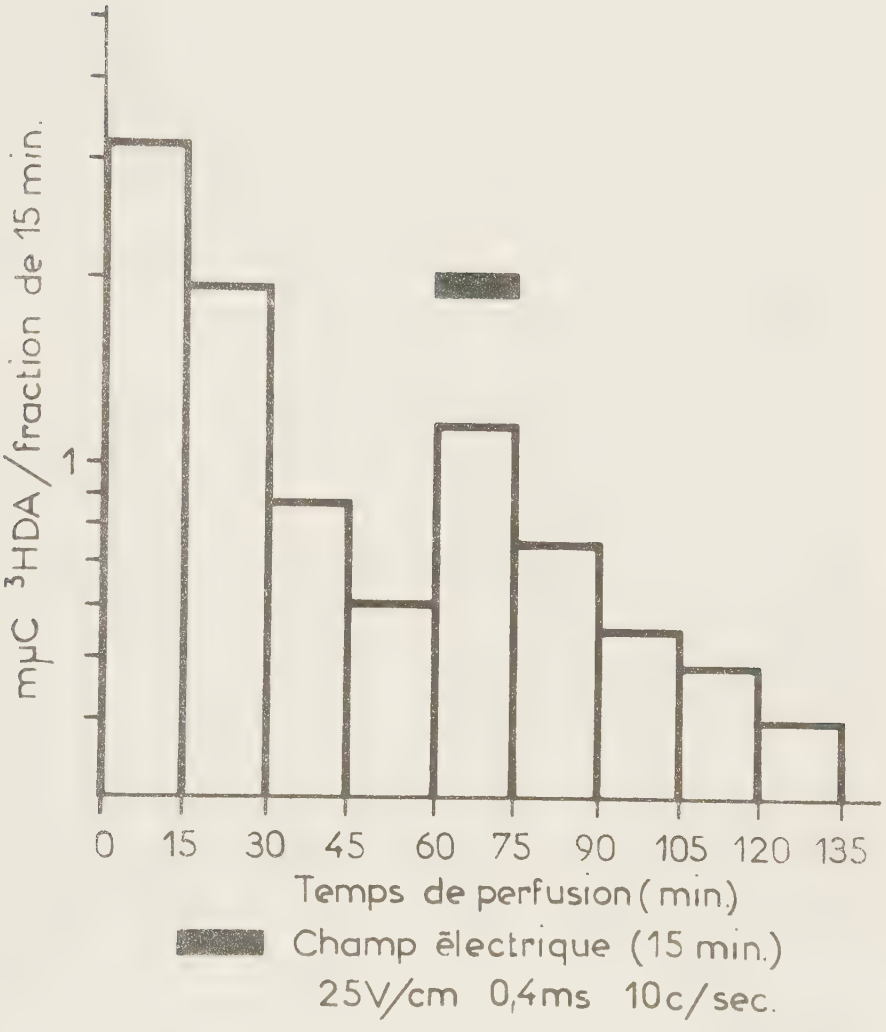


Fig.9 : Effet de la stimulation du striatum sur la libération de la ^{3}H-DA. Les striata préalablement incubés avec de la ^{3}H-tyrosine sont superfusés avec un liquide physiologique. 60 min. après le début de la superfusion, un champ électrique est appliqué, pendant 15 min., entre deux électrodes placées à la surface du striatum. (durée d'un choc 0,4 msec. fréquence de stimulation 10 c/sec). Les quantités de ^{3}H-DA libérées sont mesurées dans les fractions successives de superfusat.

hibiteur de la MAO (Horita 1959) augmente les concentrations des CA cérébrales et diminue leur vitesse de renouvellement (Glowinski et Axelrod 1965).

Nous avons donc testé les effets de ces drogues ajoutées en faible concentration dans le liquide de superfusion. L'amphétamine (10^{-6}M) ou le catron$^{(R)}$ (5×10^{-5}M) provoquent une augmentation très marquée de la libération de ^{3}H-DA (fig. 10). Les quantités de ^{3}H-DA retrouvées pendant l'addition de ces drogues sont de 2 à 3 fois plus importantes que les quantités de ^{3}H-DA libérées pendant la fraction précédent le traitement pharmacologique.

Par ailleurs, la spécificité de l'action de l'amphétamine au niveau des neurones catécholaminergiques a été vérifiée. A cet effet nous avons analysé l'effet de l'amphétamine sur la libération des CA au niveau du tronc cérébral (bulbe + pont) riche en neurones noradrénergiques (Dahlström et Fuxe 1964, Anden et coll. 1966 b), et sur la libération de la sérotonine (5-HT) au niveau du néostriatum riche en terminaisons sérotoninergiques (Fuxe et coll. 1969). Dans ce cas le tronc cérébral et le néostriatum sont incubés respectivement en présence de ^{3}H-tyrosine et de ^{3}H-tryptophane, puis superfusés. Les quantités de ^{3}H-CA ou de ^{3}H-5-HT libérées sont mesurées avant, pendant et après l'addition de d-amphétamine. La d-amphétamine (10^{-6}M) augmente la libération des ^{3}H-CA au niveau du tronc cérébral alorsqu'elle n'a pratiquement pas d'effet sur la libération de la ^{3}H-5-HT au niveau du néostriatum, même lorsqu'une concentration 100 fois plus forte de la drogue est introduite dans le milieu de superfusion (fig. 11).

3 - Effet de la thiopropérazine.

La thiopropérazine, neuroleptique puissant(Julou et coll., 1966) induit rapidement une augmentation de l'utilisation de la DA lorsque cette drogue est injectée par voie générale(Javoy et Glowinski 1971). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que des neuroleptiques comme la chlorpromazine ou l'halopéridol augmentent la vitesse de renouvellement des CA dans les neurones catécholaminergiques centraux : cette activation du métabolisme des CA résulte très vraisemblablement, comme nous le verrons plus tard, de l'effet de ces dro-

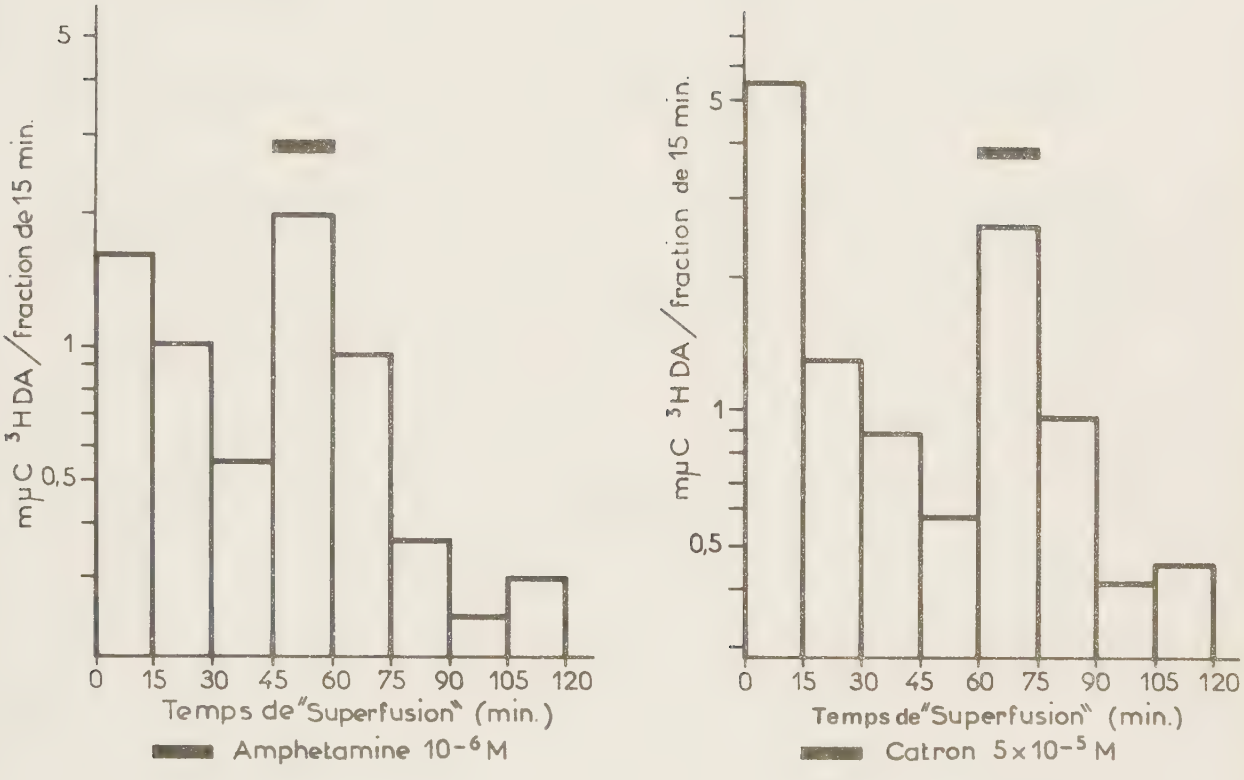


Fig.10 : Effet de drogues sur la libération de la ^{3}H-DA.
Les striata préalablement incubés en présence de ^{3}H-tyrosine sont superfusés. 45 ou 60 min. après le début de la superfusion, l'amphétamine (10^{-6}M) ou le Catron (5×10^{-5}M) est ajouté au liquide de superfusion pendant 15 minutes. La ^{3}H-DA est mesurée dans les fractions successives de superfusat.

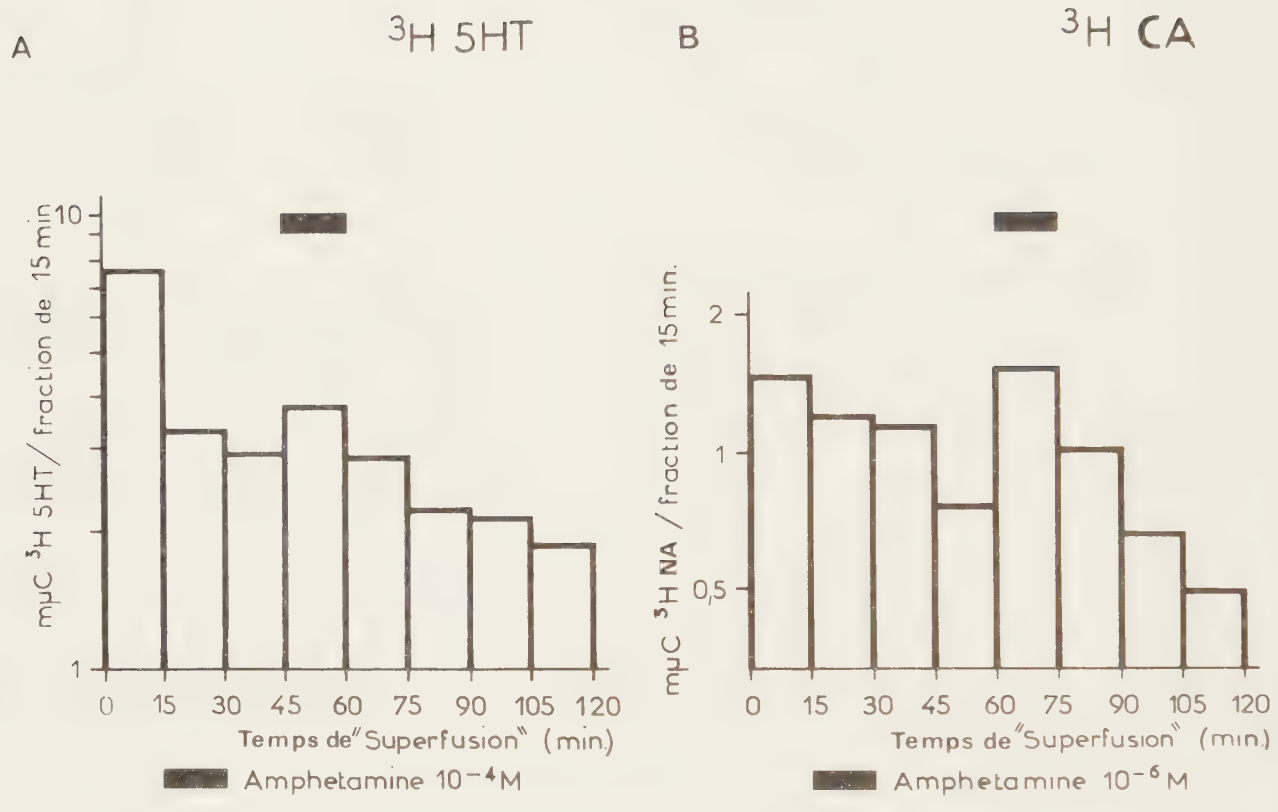


Fig.11 : Effet de l'amphétamine sur la libération de la ^{3}H-5HT et des ^{3}H-CA.

Fig.11$_A$. Le néostriatum préalablement incubé en présence de ^{3}H-tryptophane (50 μCi) est superfusé. La libération de la ^{3}H-5HT est déterminée dans les fractions successives de superfusat avant, pendant et après l'addition de d-amphétamine (10^{-4}M) au liquide de superfusion.

Fig.11$_B$. Le tronc cérébral est incubé en présence de ^{3}H-tyrosine (100 μCi) puis superfusé. Les ^{3}H-CA contenues dans les fractions successives de superfusat sont mesurées avant, pendant et après l'addition de d-amphétamine (10^{-6}M) au liquide de superfusion.

gues au niveau des récepteurs catécholaminergiques (Carlsson et Lindqvist, 1963).

L'addition de thiopropérazine (10^{-4}M) dans le liquide de superfusion n'entraîne pas de modification de la libération de ^{3}H-DA (fig. 12). Il semble donc que cette substance n'exerce pas un effet direct sur les terminaisons dopaminergiques.

4 - Effets de l'acétylcholine (ACh) et de la sérotonine (5-HT).

Les concentrations élevées d'ACh (Mac Intosh 1941) et de 5-HT (Heller et coll. 1962) trouvées dans le striatum suggèrent que ces deux substances jouent le rôle de médiateur chimique au niveau de cette structure.

La 5-HT ajoutée au liquide de superfusion (5×10^{-5}M) augmente la libération de la ^{3}H-DA de 1 à 2 fois par rapport à la fraction précédent le traitement. La récupération de la libération spontanée normale du médiateur ne se fait pas immédiatement puisque les quantités de ^{3}H-DA recueillies après la fin de l'application de la 5-HT sont encore très importantes (fig. 13).

L'ACh (5×10^{-5}M) dissoute dans le liquide de perfusion en présence d'ésérine (5×10^{-4}M) un inhibiteur de la cholinesterase, induit une augmentation de 100 % de la libération de ^{3}H-DA. L'augmentation de libération est visible pendant l'addition du médiateur cholinergique, et ne se prolonge pas comme précédemment (fig. 13). Des concentrations d'ACh 10 fois plus faibles sont inefficaces pour induire une modification de la libération de la ^{3}H-DA et par ailleurs l'ésérine est sans effet.

L'élimination des ions Ca^{++} du milieu de superfusion n'inhibe pas (ou très partiellement) l'augmentation de libération de la ^{3}H-DA néoformée, induite par l'application locale d'ACh.

Les effets de la 5-HT et de l'ACh vis à vis de la libération de la ^{3}H-DA semblent être spécifiques puisque les deux substances

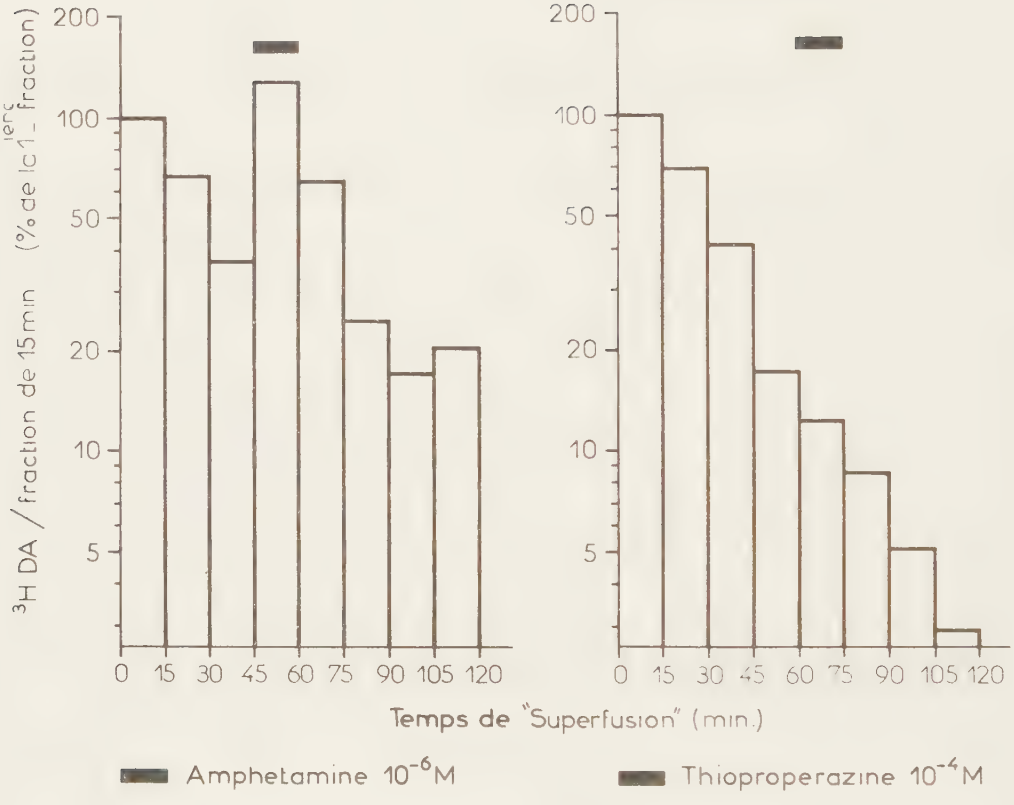


Fig.12 : Effet de la Thiopropérazine sur la libération de la ^{3}H-DA.

Les striata préalablement incubés en présence de ^{3}H-tyrosine sont superfusés. Une heure après le début de la superfusion, la thiopropérazine (10^{-4}M) est ajoutée au liquide physiologique pendant 15 min. La ^{3}H-DA est mesurée dans les fractions successives de superfusat.

A titre de comparaison, nous avons rappelé à gauche de la figure l'effet de l'amphétamine (10^{-6}M) sur la libération de la ^{3}H-DA.

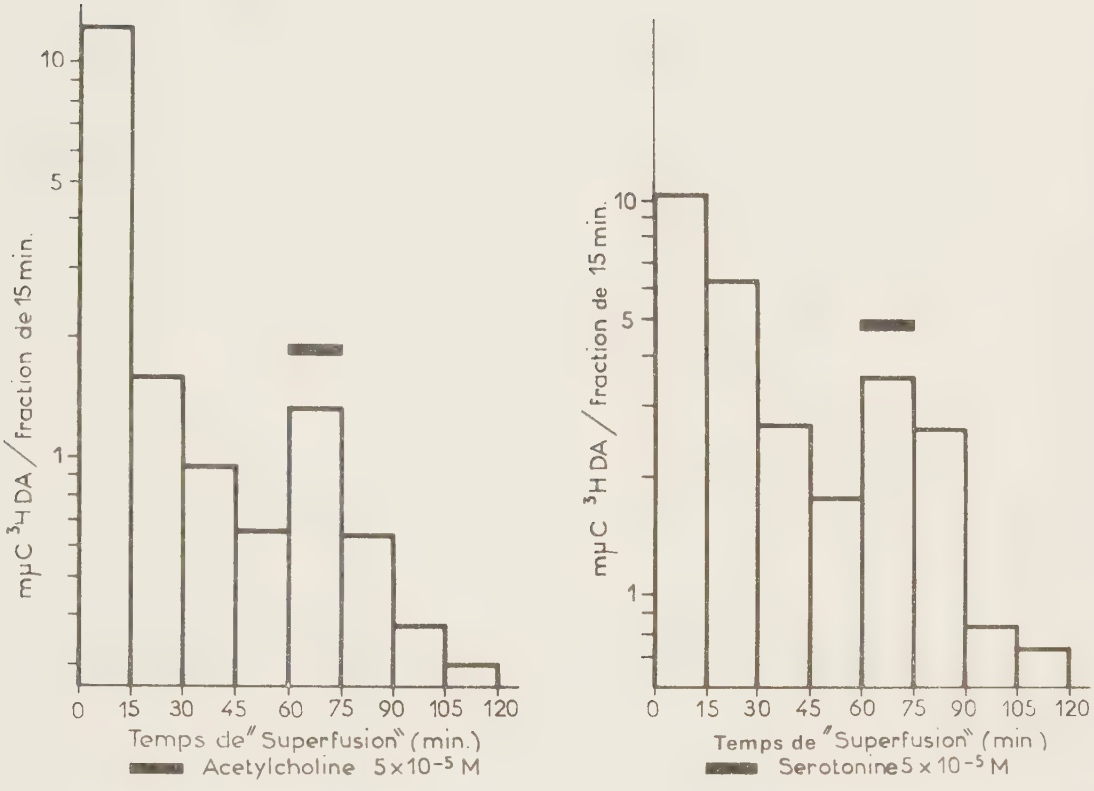


Fig.13 : Effet de l'Acétylcholine et de la sérotonine sur la libération de la ^{3}H-DA.

Les striata préalablement incubés avec de la ^{3}H-tyrosine sont superfusés. L'acétylcholine (5×10^{-5}M) en présence d'ésérine (3×10^{-5}M) ou la sérotonine (5×10^{-5}M) est ajoutée pendant 15 min. au liquide de superfusion. La ^{3}H-DA est mesurée dans les fractions successives de superfusat.

n'affectent pas la vitesse de diffusion de la ^{3}H-tyrosine (fig. 14). De plus nous avons vérifié que l'ACh n'a aucun effet sur les processus de diffusion de la ^{14}C urée ou de l'^{3}H inuline au niveau de striata préalablement incubés en présence de l'une ou de l'autre de ces substances (fig. 14). Dans une série d'expériences complémentaires, le striatum est d'abord incubé en présence de ^{3}H-DA exogène afin de marquer directement les terminaisons dopaminergiques selon une des approches précédemment décrites, puis superfusé avec un liquide physiologique ne contenant pas l'amine radioactive. L'addition d'ACh sur cette préparation, contrairement à ce que nous avons vu dans le cas de la ^{3}H-DA néoformée n'augmente pas la libération de ^{3}H-DA exogène préalablement captée par les tissus (fig. 15).

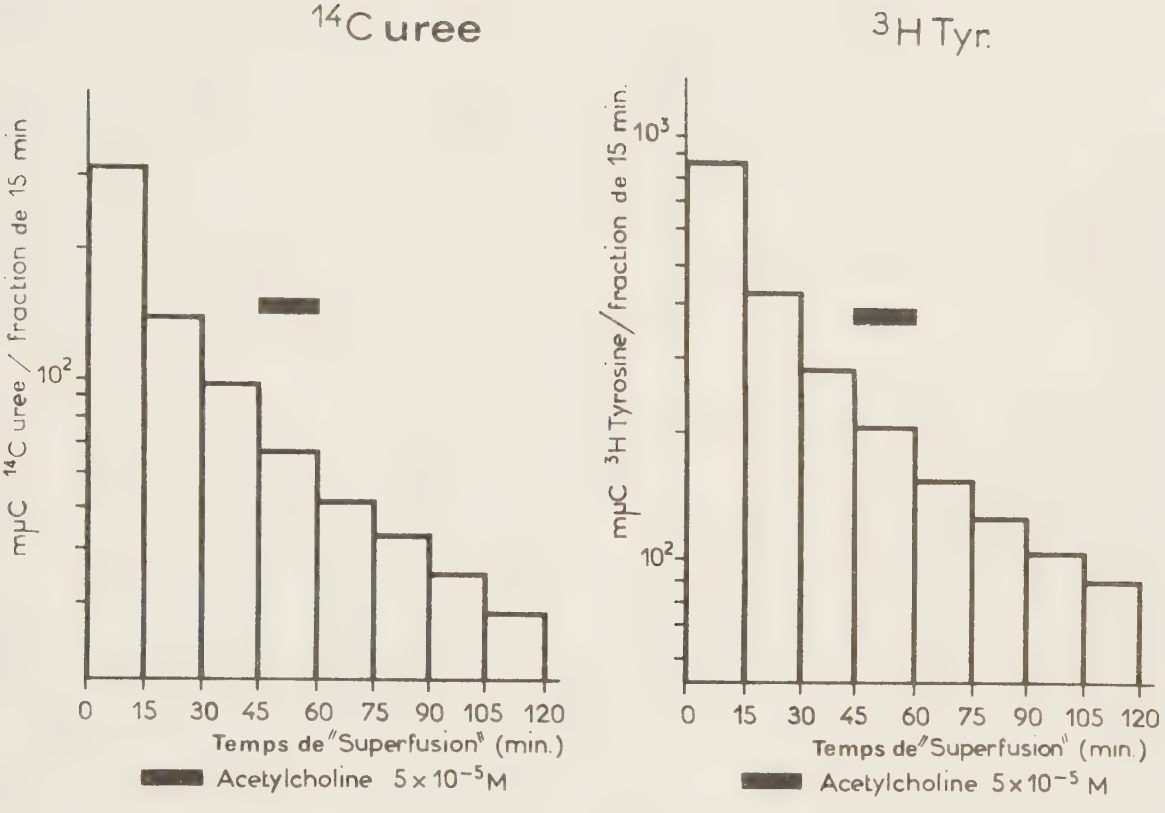


Fig.14 : Effet de l'acétylcholine sur l'efflux de l'^{14}C urée ou de la ^{3}H-tyrosine.

Les striata préalablement incubés avec de l'^{14}C urée (2,8 μCi) ou de la ^{3}H-tyrosine (16 μCi) sont superfusés. L'acétylcholine (5×10^{-5}M) en présence d'ésérine ($3,5 \times 10^{-5}$M) est ajoutée au liquide physiologique (pendant 15 min.) , 45 min. après le début de la superfusion. L'efflux de ^{14}C ou de ^{3}H est mesuré dans les fractions successives de superfusion.

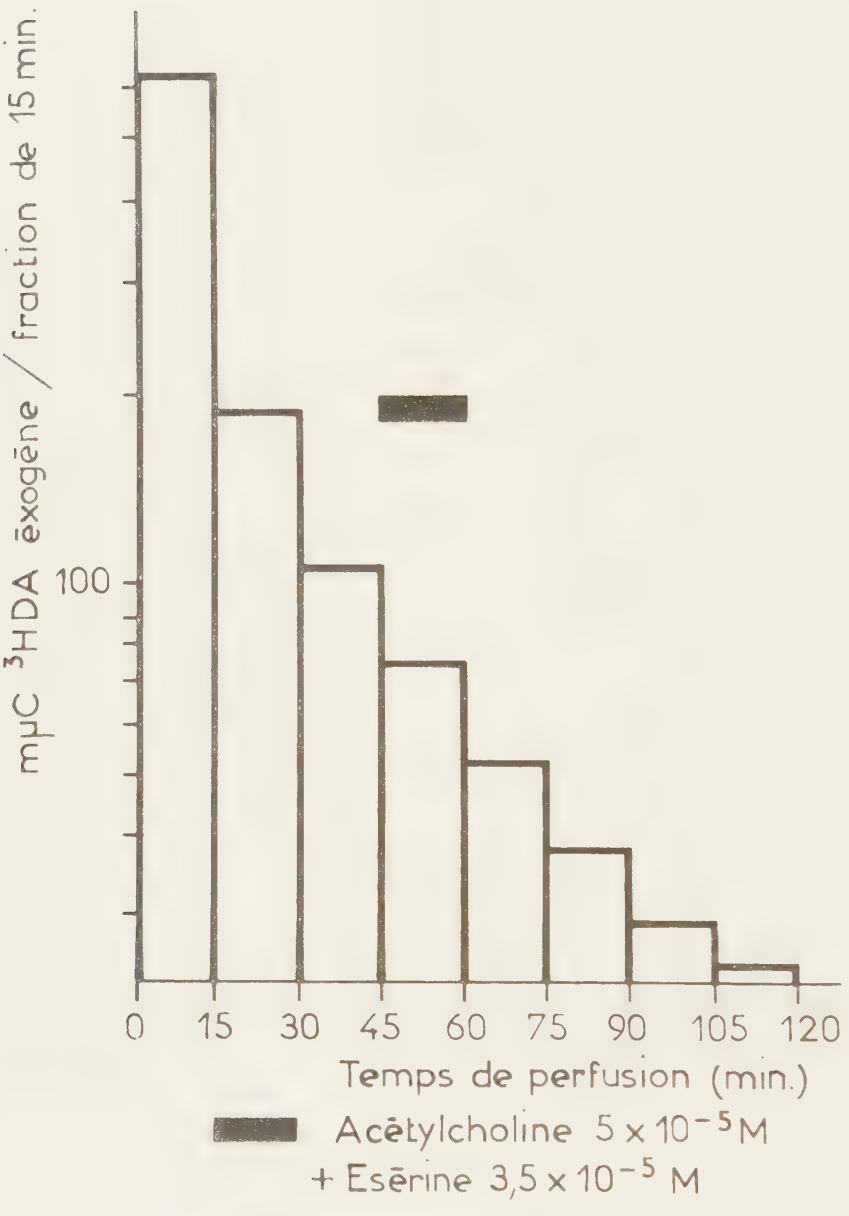


Fig.15 : Effet de l'acétycholine sur la libération de la ^{3}H-DA préalablement captée.

Les striata sont incubés avec de la ^{3}H-DA (2 μCi), lavés, puis superfusés avec un liquide physiologique non radioactif. L'acétylcholine (5×10^{-5}M) en présence d'ésérine ($3,5 \times 10^{-5}$M) est ajouté au liquide de superfusion pendant 15 min. La ^{3}H-DA libérée est mesurée dans les fractions successives de superfusats.

IV - DISCUSSION

Cette première étude faite in vitro nous a permis de mettre en évidence la libération spontanée et induite de ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine dans les terminaisons dopaminergiques du striatum chez le rat. Il faut cependant noter que les niveaux de libération de la ^{3}H-DA sont assez variables d'une expérience à l'autre. Ces variations peuvent dépendre des conditions de superfusion et notamment de la disposition du striatum dans la chambre de superfusion. Dans ces conditions une étude quantitative est difficile à réaliser. Néanmoins, cette étude nous révèle que :

1 - Les quantités de ^{3}H-DA libérées sont faibles par rapport aux quantités de ^{3}H-DA accumulées dans les tissus. Dans les meilleures conditions, la ^{3}H-DA représente 1/10 de la ^{3}H-DA contenue dans les tissus, mais généralement ce rapport est beaucoup plus faible puisqu'il décroit en fonction du temps de superfusion. Cependant il semble qu'une partie seulement de la ^{3}H-DA libérée est mesurée puisque les processus de recapture sont certainement très importants au niveau des terminaisons dopaminergiques. Dans le cas des neurones noradrénergiques il a été montré que les processus de recapture de la NA au niveau des terminaisons nécessitent de l'énergie qui peut être fournie soit au cours de phosphorylations oxydatives, soit pendant la glycolyse (Dengler et al., 1962 ; Von Euler et Lishajko , 1963 ; Hamberger, 1967). Or au niveau des terminaisons dopaminergiques du striatum nous avons remarqué que la libération induite par les ions K^{+} est fortement potentialisée par le 2-4 dinitrophénol qui empêche les phosphorylations oxydatives, et qui par conséquent doit entre autre, inhiber les processus de recapture.

2 - La libération spontanée de ^{3}H-DA n'est pas assimilable à un simple processus de diffusion. En effet, les histogrammes représentant le décours d'élimination des substances restant dans les espaces extracellulaires comme l'^{3}H-inuline ou pénétrant dans tous les espaces intra et extracellulaires comme la ^{3}H-tyrosine ou l'^{14}C urée

diffèrent de l'histogramme représentatif des quantités de ^{3}H-DA libérées. Par ailleurs, les drogues psychotropes utilisées (amphétamine et catron) ainsi que la 5-HT et l'ACh ajoutées en faible concentration au liquide de superfusion augmentent spécifiquement la libération de ^{3}H-DA sans provoquer de modifications de l'élimination des substances passant dans le liquide de superfusion par diffusion.

3 - L'histogramme des quantités de ^{3}H-DA libérées en fonction du temps de superfusion suggère que l'amine accumulée dans les tissus n'est pas distribuée de manière homogène. Le rapport des quantités de ^{3}H-DA libérées et accumulées dans les tissus évalué à différents temps après le début de la superfusion, révèle que la libération de ^{3}H-DA est plus importante pendant la synthèse de l'amine radioactive c'est à dire pendant les 45 premières minutes de superfusion. Inversement la libération de l'amine est relativement plus faible lorsque la ^{3}H-DA stockée dans les tissus a été synthétisée depuis plus longtemps. Un processus analogue a été décrit par Kopin et coll. (1968) au niveau des neurones noradrénergiques périphériques où l'amine nouvellement synthétisée est préférentiellement libérée. Une compartimentalisation de la DA semble donc exister au niveau des terminaisons dopaminergiques du striatum : un compartiment où se trouve l'amine nouvellement synthétisée et qui interviendrait préférentiellement dans les processus de libération et un compartiment dans lequel l'amine serait mise en réserve.

Au cours de cette étude il nous a d'ailleurs été possible de différencier l'action de l'ACh sur la libération de ^{3}H-DA se trouvant très vraisemblablement dans deux formes de stockage différent . Ainsi l'ACh n'induit pas d'augmentation de libération de ^{3}H-DA exogène préalablement captée par les terminaisons dopaminergiques alorsqu'elle induit toujours une augmentation de la libération de ^{3}H-DA néoformée. De même Bustos et Roth (1972) travaillant dans des conditions analogues ont montré que le gamma hydroxybutyrate antagonise partiellement l'augmentation de libération de la ^{3}H-DA néoformée induite par les ions K^{+}, mais non celle de la ^{3}H-DA exogène préalablement captée par le tissu.

L'existence de plusieurs formes de stockage des CA au niveau

des neurones centraux a déjà été proposé par Glowinski et coll.(1965) sur la base de résultats expérimentaux obtenus en suivant la disparition multiphasique de la ^{3}H-NA après injection intraventriculaire. De même Sedvall et coll. (1968) estiment que la vitesse réelle de synthèse de la NA dépasse largement la vitesse de synthèse de la NA calculée à partir des études de "turnover".

En conclusion, ces premières expériences ont permis de mettre en évidence la libération, spontanée et induite par la dépolarisation des terminaisons nerveuses, de la ^{3}H-DA préalablement formée à partir de son précurseur. Elles ont d'autre part montré qu'il est possible de révéler les effets particuliers de certaines drogues psychotropes sur la libération de médiateur de certains systèmes de neurones aminergiques.

Finalement la démonstration de l'augmentation de la libération de la DA induite par l'ACh et la 5-HT permet d'envisager de nombreuses relations interneuronales au niveau du striatum.

CHAPITRE II

LIBERATION ET SYNTHESE DE LA ^{3}H-DA AU NIVEAU DE COUPES DE STRIATUM CHEZ LE RAT -
EFFETS DE QUELQUES DROGUES PSYCHOTROPES -

Les résultats obtenus au chapitre précédent montrent que la DA néoformée intervient préférentiellement dans les processus de libération. Cependant au cours des expériences de superfusion, comme nous l'avons mentionné, les quantités de ^{3}H-DA libérées ne peuvent être comparées d'une expérience à l'autre. Par ailleurs, les quantités de ^{3}H-DA accumulées dans les tissus ne sont pas connues pour chaque fraction de la superfusion. Il est donc difficile d'établir des corrélations entre la libération et l'accumulation de ^{3}H-DA pendant les différents traitements pharmacologiques étudiés.

L'examen de ces résultats nous a amené à développer une technique qui permet de mesurer simultanément la libération et l'accumulation dans les tissus de la ^{3}H-DA . Ces différentes conditions sont réalisées en incubant des coupes de striatum en présence de ^{3}H-tyrosine et en mesurant d'une part la ^{3}H-DA libérée dans les milieux d'incubation et d'autre part la ^{3}H-DA accumulée dans les tissus.

Par cette méthode, nous avons pu étudier les modifications de libération de la ^{3}H-DA intervenant après l'administration de certaines drogues psychotropes. Cependant la détermination de l'accumulation de la ^{3}H-DA dans les tissus donne une valeur sous estimée de la synthèse à partir de la ^{3}H-tyrosine si une partie de l'amine nouvellement synthétisée est dégradée. Nous avons donc mis au point une technique permettant de mesurer les quantités réelles de ^{3}H-DA synthétisée. Le taux de conversion de la L, 3-5, ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA qui reflète l'activité de l'étape limitante de la biosynthèse de la DA est évalué en mesurant l'^{3}H-H_2O formée lors de l'hydroxylation de la ^{3}H-tyrosine. L'étude de la synthèse de la ^{3}H-DA a d'autre part été complétée en mesurant in vitro l'activité de la tyrosine hydro-

xylase partiellement purifiée.

L'ensemble de ces différentes approches permet de comprendre si les modifications de synthèse de la ^{3}H-DA induites par les drogues psychotropes utilisées sont associées à des changements d'activité de la tyrosine hydroxylase, détectable in vitro ou si au contraire d'autres mécanismes interviennent dans la régulation de la synthèse de la ^{3}H-DA.

Après avoir développé les techniques utilisées pour cette étude, nous analysons les effets induits par certaines drogues psychotropes connues pour modifier le métabolisme des CA cérébrales.

Trois drogues psychotropes sont étudiées : d'une part l'amphétamine, d'autre part la réserpine et la thiopropérazine : un neuroleptique du type des phénothiazines.

Ces drogues ont été choisies parce qu'elles produisent chez le rat des effets pharmacologiques très caractéristiques au niveau du comportement moteur. L'amphétamine augmente l'activité locomotrice et fait apparaître des mouvements stéréotypés (Randrup et Munkvad 1966 - 1968). Inversement, une réduction de l'activité locomotrice spontanée et l'apparition d'un état cataleptique sont observés après l'injection de réserpine (Bein 1956) ou d'un neuroleptique du type des butyrophénones ou des phénothiazines (Delay et Deniker 1961 , Berheimer et Hornykiewicz 1965 a).

Il nous a donc paru intéressant d'analyser l'incidence biochimique de ces drogues au niveau des terminaisons dopaminergiques des neurones nigro-striataux qui sont intégrés au système extra pyramidal (Poirier et coll. 1972).

I - TECHNIQUES DEVELOPPEES POUR ETUDIER LA SYNTHESE ET LA LIBERATION DE LA ^{3}H-DA AU NIVEAU DE COUPES DE STRIATUM DU RAT -

1 - Mesure de la libération et de l'accumulation de ^{3}H-DA.

Les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de sérum physiologique, ou d'un liquide physiologique dans lequel est dissoute la drogue étudiée, et sont tués par décapitation à des temps variables après l'injection de la drogue.

Afin de minimiser les effets dus aux variations circadiennes de la synthèse de la DA (Javoy 1972), le prélèvement du cerveau est effectué alternativement sur un rat témoin et sur un rat traité. Au fur et à mesure des prélèvements, les striata sont disséqués , coupés en lamelles de 0,3 mm d'épaisseur à l'aide d'un appareil de Mac Illwain. Ces différentes manipulations sont effectuées à 4°C.

Les coupes de tissus sont préincubées à 37°C pendant 2 minutes dans 1 ml de liquide physiologique. La ^{3}H-tyrosine est ensuite ajoutée et l'incubation se poursuit pendant 15 minutes sous atmosphère d'O_2-CO_2 (95 : 5 v/v). En fin d'incubation, les échantillons sont recueillis sur de la glace pour arrêter les réactions biochimiques. Les coupes sont séparées du milieu d'incubation par centrifugation à faible vitesse pendant 3 minutes à 4°C ou par filtration sur millipore.

Les coupes sont homogénéisées avec un appareil Polytron PT 10 - 0 D, dans 5 ml d'éthanol eau (3 : 1 v/v) contenant 0,2 ml de la solution stabilisatrice ; 3 ml d'alcool absolu contenant 0,2 ml de solution stabilisatrice sont ajoutés aux milieux d'incubation. Les échantillons sont conservés à -17°C jusqu'à l'analyse biochimique. (Voir chapitre techniques biochimiques).

L'identification des ^{3}H-CA contenues dans les éluats de l'alumine est obtenue après cochromatographie. Les ^{3}H-CA retrouvées à la fin de l'analyse sont acétylées et séparées par cochromatographie

sur papier. Un seul pic radioactif, localisé au niveau de la tache d'acétyl DA, est détecté dans le cas des milieux d'incubation ainsi que des tissus, révélant la présence unique d'^{3}H-DA.

2 - Estimation de la synthèse de ^{3}H-DA par la mesure de l'eau tritiée.

a - Principe.

Dans cette étude, la synthèse de la ^{3}H-DA est mesurée au niveau des coupes de striatum, en déterminant le taux de conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA qui est l'étape limitante de la synthèse des CA (Levitt et coll. 1965 ; Nagatsu et coll. 1964). La vitesse de formation de la ^{3}H-DOPA à partir de la L, 3-5, ^{3}H-tyrosine est estimée en mesurant l'^{3}H-H_2O formée au cours de la réaction d'hydroxylation (fig.16). Cette méthode utilisée pour évaluer l'activité de la tyrosine hydroxylase in vitro (Nagatsu et coll. 1964 a ; Levitt et coll. 1967) est adaptée à des coupes de striatum, et l'accumulation initiale de la ^{3}H-DA est comparée aux quantités d'^{3}H-H_2O formées.

b - Mise au point de la technique de séparation de l'^{3}H-H_2O.

Lorsque l'activité de la tyrosine hydroxylase est mesurée in vitro, l'^{3}H-H_2O formée est séparée de la ^{3}H-tyrosine par passage du milieu réactionnel sur une résine Dowex H^+ qui fixe la ^{3}H-tyrosine (Nagatsu et coll. 1964 a). Au niveau des tissus intacts, il peut se former des métabolites neutres et acides. Ceux ci ne sont pas retenus sur la résine Dowex H^+ ; c'est pourquoi cette technique de séparation n'a pas été utilisée. Dans cette étude, nous avons réalisé une distillation pour séparer l'^{3}H-H_2O de la ^{3}H-tyrosine et des ^{3}H-métabolites. Il est cependant nécessaire de prendre certaines précautions et notamment de purifier soigneusement la ^{3}H-tyrosine pour éliminer les produits tritiés formés par autoradiolyse de l'acide aminé tritié. Par ailleurs la distillation est effectuée sous pression réduite à température relativement basse (37°C) afin de diminuer la dégradation de la ^{3}H-tyrosine pendant la distillation. De plus, la contamination due aux produits de fin de distillation est évitée. Pour cela un volume assez important est distillé (2 ml) et seule l'^{3}H-H_2O recueillie au début de la distillation est mesurée.

c - Protocole opératoire.

Les coupes de striatum sont incubées dans 1 ml de liquide physiologique contenant 25 µ Ci de ^{3}H-tyrosine. L'incubation est arrêtée par addition de 2 ml d'acide perchlorique 0,5 N contenant 0,2 ml de la solution stabilisatrice. Les coupes et le milieu d'incubation sont homogénéisés ensemble, placés 2 heures à -17°C puis centrifugés à 4°C pendant 20 minutes. La ^{3}H-DA est mesurée sur une partie aliquote du surnageant (0,5 ml) conservée jusqu'à l'analyse biochimique à -17°C dans un mélange d'éthanol et d'eau(5 ml) contenant 0,2 ml de solution stabilisatrice.

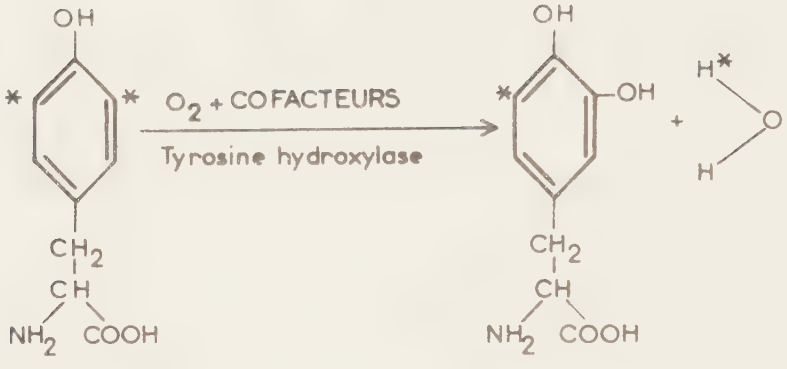
Le volume restant du surnageant est amené à un pH voisin de 7 par addition de bicarbonate de sodium puis distillé à 37°C sous pression réduite (voir schéma de montage fig. 16). La vapeur d'eau est condensée dans un tube à essai maintenu à 0°C jusqu'à l'obtention d'un volume d'eau distillée de 0,5 ml. La radioactivité de l'^{3}H-H_2O est mesurée sur une partie du distillat (0,2 ml) en présence de 4 ml d'éthanol-méthanol (3-1 v/v) et 10 ml du mélange scintillant (toluène - POPOP - PPO).

d - Résultats : mesure de l'accumulation de la ^{3}H-DA et de l'eau tritiée en fonction du temps d'incubation.

Les quantités de ^{3}H-H_2O et de ^{3}H-DA contenues dans les tissus et les liquides d'incubation augmentent linéairement pendant les 30 premières minutes d'incubation. Par ailleurs, les quantités de ^{3}H-DA retrouvées aux différents temps examinés sont sensiblement égales aux quantités d'^{3}H-H_2O formées (fig. 17).

e - Spécificité de la méthode.

Il est nécessaire de vérifier que l'eau tritiée formée lors de l'incubation de coupes de striatum en présence de L-3.5^{3}H-tyrosine provient uniquement de l'hydroxylation de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA et non pas d'une autre voie métabolique. Cette vérification est obtenue en mesurant la formation d'^{3}H-H_2O après inhibition de la synthèse de la DA. Les animaux sont prétraités avec un inhibiteur de la synthèse des CA, l'α-MpT (100 mg/kg i.p. 30 minutes avant le sacrifice) et les quantités d'^{3}H-H_2O et de ^{3}H-DA formées au niveau des striata sont déterminées 30 minutes après l'injection de la drogue. La formation d'^{3}H-H_2O est diminuée de 90 % par rapport aux valeurs



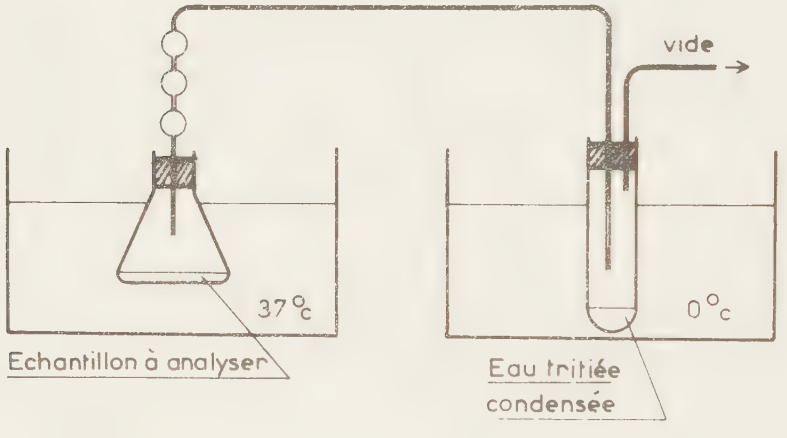


Fig.16 A : Réaction d'hydroxylation de la L, 3-5, ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA, avec formation d'une molécule d'^{3}H-H_2O.

Fig.16 B : Schéma de l'appareil permettant de distiller les superfusats.

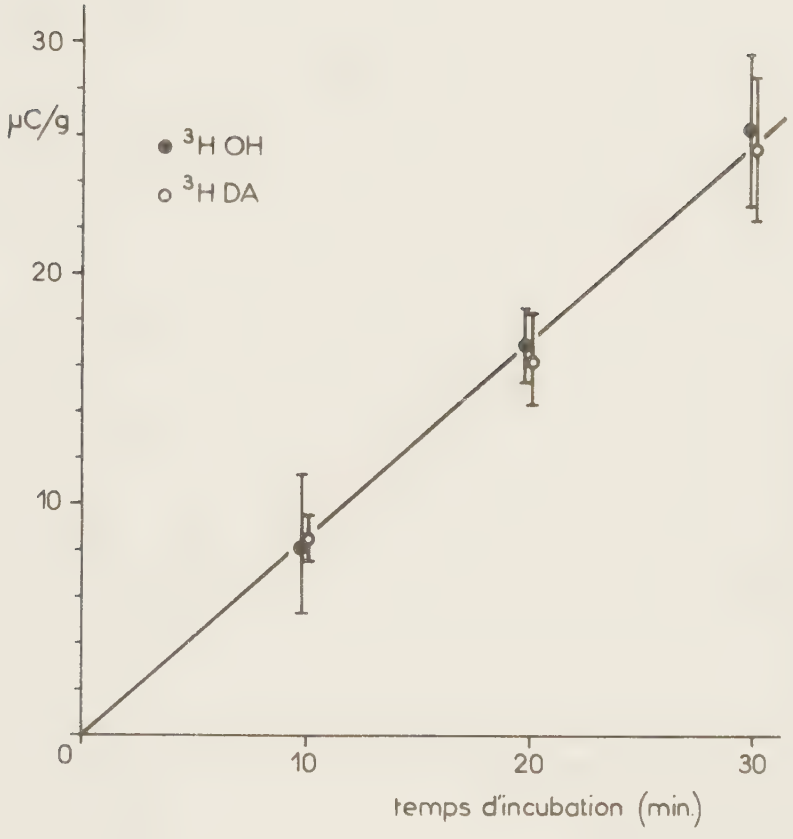


Fig.17 : Formation de ^{3}H-DA et d'^{3}H-H_2O à partir de ^{3}H-tyrosine au niveau de coupes de striatum de rats témoins.

Les coupes de striatum sont incubées avec 25 µCi de L, 3-5, ^{3}H-tyrosine pendant différents temps (10, 20 et 30 min.). La ^{3}H-DA et l'^{3}H-H_2O accumulées dans les tissus et les milieux d'incubation sont déterminées. Chaque point correspond à la moyenne des résultats obtenues avec 8 striata ± l'erreur standard.

TABLE

Effets d'un prétraitement avec de l'αmpT sur la formation de ^{3}H-DA et d'^{3}H-H_2O au niveau de coupes de striatum.

µCi/g	Témoins	αmpT	% changement
^{3}H-H_2O	0,80 ± 0,	1,91 ± 0,19	-
^{3}H-DA	0,07 ± 0,	0,68 ± 0,16	- 9

Les rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique (témoins)ou d'αmpT (100 mg/kg) 30 minutes avant d'être sacrifiés. Les coupes de striatum sont incubées 15 minutes dans 1 ml de liquide physiologique contenant 25 µCi de ^{3}H-tyrosine (56,8 Ci/mmole). L'^{3}H-H_2O et la ^{3}H-DA accumulées dans les milieux d'incubation et les tissus sont mesurées. Les résultats expriment la valeur moyenne ± l'erreur standard, calculée à partir de déterminations faites sur 8 striata.

trouvées chez les témoins ; les quantités de ^{3}H-DA sont également diminuées dans les mêmes proportions (table 2). Comme une faible accumulation de ^{3}H-DA persiste après traitement avec de l'αMpT, l'inhibition de synthèse n'est pas totale. Par conséquent les faibles quantités de ^{3}H-H_2O retrouvées proviennent d'une synthèse résiduelle.

Ces résultats nous indiquent que la mesure de l'eau tritiée formée, permet d'obtenir la valeur réelle du taux de conversion de la L-3.5- ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA. Par ailleurs ces premiers résultats montrent que la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée est faiblement dégradée in vitro, contrairement à ce qui se passe in vivo (Javoy et coll., 1972).

f - Limites de la méthode.

La limite de détection de formation d'^{3}H-H_2O est donnée par la valeur du blanc, obtenue en incubant pendant 15 minutes en présence de ^{3}H-tyrosine des coupes de striatum préalablement inactivées par un chauffage à 100°C pendant 1 minute. Après l'incubation, les coupes et le milieu sont homogénéisés ensemble puis centrifugés. Les surnageants sont distillés comme précédemment. Dans les expériences de synthèse de la ^{3}H-DA, évaluée au niveau du striatum du rat, les valeurs d'eau tritiée obtenues sont 10 à 15 fois supérieures aux valeurs obtenues pour le blanc (la valeur du blanc est en grande partie dépendante de la purification de la ^{3}H-tyrosine).

II - ETUDE DES EFFETS DE L'AMPHETAMINE SUR LA SYNTHESE ET LA LIBERATION DE LA DA -

1 - Effets de l'amphétamine sur la libération et l'accumulation de la ^{3}H-DA.

Les résultats obtenus précédemment montrent que l'amphétamine, appliquée localement au niveau des terminaisons dopaminergiques du striatum du rat, augmente la libération de la ^{3}H-DA.

Cette étude faite en utilisant une nouvelle approche nous permet de vérifier si les effets de l'amphétamine induits in vivo persistent in vitro.

a - Protocole opératoire :

Les rats reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique (témoins) ou de d-amphétamine (5 mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés, coupés, puis incubés pendant 15 minutes en présence de ^{3}H-tyrosine contenue dans 1 ml de liquide physiologique. La ^{3}H-DA libérée dans les milieux d'incubation ainsi que la ^{3}H-DA accumulée dans les coupes est mesurée. Par ailleurs les quantités de ^{3}H-tyrosine captées dans les coupes sont déterminées. Dans une série d'expériences complémentaires, les taux de DA endogène sont mesurés au niveau des striata des rats témoins et des rats traités avec de l'amphétamine.

b - Résultats :

Les quantités de ^{3}H-DA libérées sont augmentées de 250 % au niveau des coupes de striatum de rats prétraités avec de l'amphétamine par rapport aux valeurs obtenues chez les témoins (table 3). Inversement une diminution d'accumulation de ^{3}H-DA (-55 %) est observée au niveau des coupes. L'amphétamine augmente par conséquent le pourcentage des quantités de ^{3}H-DA libérées par rapport aux quantités d'amine radioactive accumulées dans les tissus. Par contre l'accumulation de ^{3}H-tyrosine n'est pas significativement modifiée

TABLE 3

Effets de la d-amphétamine sur la libération et l'accumulation de ^{3}H-DA

	Témoins	Amphétamine	% changement
LCR ^{3}H-DA libérée mμCi/g	244 ± 26	868 ± 46	+ 255 *
Tissus ^{3}H-DA accumulée mμCi/g	7845 ± 733	3527 ± 403	- 55 *
^{3}H-DA totale mμCi/g	8089 ± 759	4395 ± 449	- 46 *
$\frac{^{3}\text{H-DA LCR}}{^{3}\text{H-DA Tissus}}$ %	3,1	24,6	
Tissus ^{3}H-tyrosine μCi/g	95 ± 3	89 ± 3	n.s

* $p < 0,01$

Les rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique (témoins) ou d'amphétamine (5mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés, coupés et incubés pendant 15 minutes dans 1 ml de liquide physiologique contenant 25 μCi de ^{3}H-tyrosine(27 Ci/mmole). La ^{3}H-DA et la ^{3}H-tyrosine sont ensuite mesurées dans les liquides d'incubation et dans les coupes. Les valeurs données correspondent à la moyenne de 8 déterminations effectuées sur 8 striata ± erreur standard.

(table 3). Assez paradoxalement malgré la diminution d'accumulation de ^{3}H-DA observée, les taux de DA endogène (table 4) restent inchangés après le prétraitement avec de l'amphétamine.

c - Discussion :

Le prétraitement des animaux avec de la d-amphétamine augmente la libération de la ^{3}H-DA au niveau des coupes de striatum du rat. Cet effet résulte vraisemblablement d'une action directe de l'amphétamine qui est captée par les terminaisons dopaminergiques et les tissus voisins. L'augmentation de libération de la ^{3}H-DA peut s'expliquer par des effets simultanés ou non de l'amphétamine au niveau des terminaisons dopaminergiques provoquant une activation de la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée et/ou une inhibition des processus de recapture (Coyle et Snyder 1969 b). Par ailleurs, la diminution d'accumulation de la ^{3}H-DA observée après prétraitement des animaux avec de l'amphétamine peut résulter d'une plus grande utilisation extraneuronale de l'amine puisque la libération est considérablement augmentée. En accord avec nos résultats, Javoy et coll. (1970) observent in vivo, en injectant localement de la ^{3}H-tyrosine dans le striatum, une diminution d'accumulation de ^{3}H-DA après prétraitement des animaux avec de l'amphétamine. Par ailleurs, les taux de DA endogène ne sont pas modifiés 90 minutes après l'injection d'amphétamine. Des résultats identiques en ce qui concerne les effets de l'amphétamine sur la DA endogène sont retrouvés par d'autres auteurs (Corrodi et coll., 1967 a) ; Fuxe et Ungerstedt, 1970). Cependant, alors que les taux de DA endogène restent constants, l'accumulation de ^{3}H-DA est diminuée. Ces effets peuvent rendre compte d'une action complexe de l'amphétamine au niveau des différentes formes de stockage de la DA, ou d'une modification de la synthèse de la DA.

2 - Comparaison des effets de l'amphétamine et de la desméthylimipramine (DMI) sur la libération et l'accumulation de ^{3}H-DA.

La DMI est une drogue principalement connue par ses propriétés antidépressives. Par ailleurs, contrairement à l'amphétamine la DMI injectée à des rats ne provoque pratiquement aucune modification du comportement moteur de l'animal. D'un point de vue biochimique, la

TABLE 4

Effet de l'amphétamine sur les taux de DA du striatum du rat.

Traitement	DA µg/g
Témoins	7,8 ± 0,5
d-Amphétamine 5 mg/kg	8,1 ± 0,8

Les rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique (témoins) ou de d-amphétamine (5 mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés, homogénéisés. La DA endogène est dosée par spectrofluorimétrie. Les valeurs obtenues correspondent à la valeur moyenne de 8 dosages effectués sur 8 striata ± l'erreur standard.

DMI agit davantage sur le métabolisme de la NA que sur celui de la DA (Glowinski et coll., 1966 a). La comparaison des effets de ces deux drogues au niveau des neurones dopaminergiques permet donc de vérifier la spécificité des effets obtenus en utilisant cette nouvelle approche.

a - Protocole opératoire :

Des rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique, de DMI (5 mg/kg) ou de d-amphétamine (5 mg/kg) et sont tués respectivement 30 et 90 minutes après l'injection. Les cerveaux sont prélevés et les striata disséqués, coupés et incubés pendant 15 minutes en présence de ^{3}H-tyrosine. La ^{3}H-DA est mesurée dans les milieux d'incubation et dans les coupes.

b - Résultats :

L'augmentation de libération de ^{3}H-DA dans les milieux d'incubation ainsi que la diminution d'accumulation de ^{3}H-DA dans les coupes est retrouvée après traitement des animaux avec de l'amphétamine. Par contre la DMI n'affecte ni la libération, ni l'accumulation de ^{3}H-DA au niveau des terminaisons dopaminergiques du striatum (table 5).

c - Discussion :

Le prétraitement des animaux avec de la DMI ne modifie pas la libération de ^{3}H-DA. Par conséquent, les processus de libération ainsi que les processus de recapture ne sont pas affectés par cette drogue au niveau des terminaisons dopaminergiques. Ces données confirment les résultats de Snyder et coll., 1968, qui montrent in vitro que la DMI inhibe la recapture de la NA au niveau des neurones noradrénergiques mais modifie peu la recapture de la DA au niveau des neurones dopaminergiques. De même, Fuxe et Ungerstedt (1968) observent grâce aux techniques d'histochimie de fluorescence, que la DMI n'affecte pas l'accumulation des CA exogènes dans les neurones dopaminergiques. Par ailleurs, comme l'accumulation et la libération de ^{3}H-DA sont identiques chez les animaux prétraités avec de la DMI et les animaux témoins, la DMI ne modifie pas le métabolisme de la DA , ce qui est en accord avec d'autres études (Glowinski et coll., 1966a, Neff et Costa, 1966). Il est donc possible, grâce à cette approche, de déterminer des effets spécifiques induits par des drogues psycho-

TABLE 5

Comparaisons des effets de l'amphétamine et de la DMI sur l'accumulation et la libération de ^{3}H-DA au niveau des terminaisons dopaminergiques du striatum du rat.

Traitement	Tissus ^{3}H-DA (mμCi/g)	LCR ^{3}H-DA (mμCi/g)	$\frac{^{3}\text{H-DA LCR}}{^{3}\text{H-DA Tissus}}$ %
Sérum Physiologique	6932 ± 932	468 ± 40	6,8
d-amphétamine (5mg/kg)	3668 ± 368 * - 47 %	932 ± 80 ** + 100 %	28,1
DMI (5mg/kg)	6868 ± 1268 n.s	468 ± 108 n.s	6,8

* $P < .02$ ** $P < .001$ n.s non significatif

Des rats (groupes de 6 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique, d'amphétamine (5mg/kg - 90 minutes avant d'être sacrifiés) ou de DMI (5mg/kg - 30 minutes avant d'être sacrifiés). Les striata sont disséqués, coupés et incubés pendant 15 minutes dans 1 ml. de liquide physiologique contenant 25 μCi de ^{3}H-tyrosine (27,3 Ci/mmole). La ^{3}H-DA est déterminée dans les milieux d'incubation et dans les coupes. Les valeurs correspondent à la moyenne de 6 déterminations ± l'erreur standard.

tropes au niveau des neurones dopaminergiques nigro-striataux.

Cependant, cette technique d'étude de la libération et de l'accumulation de ^{3}H-DA n'est pas totalement satisfaisante, puisqu'elle ne permet pas d'évaluer les taux de synthèse de ^{3}H-DA. En effet une partie de la ^{3}H-DA peut être dégradée et échapper ainsi à la mesure. Par ailleurs, l'évaluation des métabolites formés est rendue très difficile par la présence de fortes quantités de ^{3}H-tyrosine qui entraînent toujours une contamination.

L'étape suivante de cette étude est donc la détermination des taux réels de la synthèse de la ^{3}H-DA qui est obtenue en mesurant l'^{3}H-H_2O formée pendant la conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA.

3 - Synthèse et accumulation de ^{3}H-DA au niveau du striatum de rats prétraités avec de l'amphétamine.

a - Protocole opératoire :

Les rats reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique ou d'amphétamine (5mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés et incubés pendant 15 minutes en présence de ^{3}H-tyrosine. L'eau tritiée formée ainsi que la ^{3}H-DA accumulée sont mesurées globalement au niveau des coupes et du milieu d'incubation. Dans une série d'expériences complémentaires, les coupes sont séparées du milieu d'incubation par filtration; la tyrosine endogène et tritiée est mesurée.

b - Résultats et discussion :

Le prétraitement des animaux avec de l'amphétamine induit une diminution du taux de conversion de la L-3.5-^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA qui est de 40 % par rapport aux valeurs obtenues pour les animaux témoins. L'accumulation de ^{3}H-DA diminue dans les mêmes proportions (39 % de diminution par rapport aux contrôles) (table 6). Il est par ailleurs intéressant de noter que dans nos conditions expérimentales la dégradation de l'amine est faible, puisque aussi bien chez les témoins que chez les animaux traités avec de l'amphétamine , les quantités de ^{3}H-DA accumulées représentent environ 85 % des quantités de ^{3}H-H_2O formées.

TABLE 6

Comparaison des effets de l'amphétamine sur la formation d'$^{3}H-H_2O$ et l'accumulation de ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum incubées en présence de ^{3}H-tyrosine.

	Témoins	Amphétamine	% changement
$^{3}H-H_2O$ µCi/g	12,0 ± 1,1	7,2 ± 0,5 *	- 40
^{3}H-DA µCi/g	10,2 ± 1,0	6,2 ± 0,3 *	- 39
% $\frac{^{3}H\text{-DA}}{^{3}H-H_2O}$	85	86	n.s

* P < .001

Des rats (groupes de 4 animaux)reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique (Témoins) ou de d-amphétamine (5mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés, coupés et incubés pendant 15 minutes dans 1 ml de liquide physiologique contenant 25 µCi de ^{3}H-tyrosine (58 Ci/mmole). Les tissus et les milieux d'incubation sont homogénéisés ensemble. La ^{3}H-DA est dosée sur 0,5 ml du surnageant et l'$^{3}H-H_2O$ est mesurée sur la partie restante. Les résultats expriment la moyenne ± l'erreur standard, des valeurs trouvées pour 8 striata correspondant à 4 animaux.

TABLE 7

Effet de l'amphétamine sur l'activité spécifique de la tyrosine au niveau de coupes de striatum de rat incubées en présence de ^{3}H-tyrosine.

	Témoins	Amphétamine	% changement
^{3}H-tyrosine µCi/g	105,8 ± 3,5	104,3 ± 3,1	n.s
Tyrosine µg/g	17,4 ± 1,2	16,5 ± 1,1	n.s
A.S µCi/µg	6,77	6,32	n.s

n.s : non significatif

Les rats (groupes de 3 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique (témoins)ou de d-amphétamine (5 mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont disséqués, incubés pendant 15 minutes en présence de ^{3}H-tyrosine (25 µCi 56,5 Ci/mmole). En fin d'incubation, les coupes sont séparées du milieu d'incubation par filtration. La tyrosine endogène et la ^{3}H-tyrosine sont mesurées dans les coupes. Les résultats représentent la moyenne ± erreur standard des valeurs trouvées pour 6 striata.

Par ailleurs, l'accumulation de la ^{3}H-tyrosine, ainsi que l'activité spécifique de la tyrosine au niveau des coupes de striatum de rats après prétraitement avec de l'amphétamine n'est pas significativement modifiée par rapport aux valeurs trouvées chez les témoins (table 7). La diminution de formation de l'^{3}H-H_2O induite par l'amphétamine correspond donc à une inhibition réelle de la synthèse de la ^{3}H-DA, qui intervient au niveau de la transformation de la tyrosine en DOPA. Le problème est donc de savoir si l'amphétamine agit directement sur la tyrosine hydroxylase, ou indirectement en modifiant les concentrations de DA au niveau du "pool" contrôlant la synthèse. Nous avons, par conséquent, regardé les effets de l'amphétamine sur l'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée in vitro, après une injection unique d'amphétamine, puis après des injections répétées d'amphétamine.

4 - Activité in vitro de la tyrosine hydroxylase du striatum après un prétraitement avec de l'amphétamine.

a - Protocole opératoire :

Les rats reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique ou d'amphétamine (5 mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés homogénéisés dans du tampon. La tyrosine hydroxylase est partiellement purifiée et son activité est mesurée in vitro selon le protocole décrit dans les méthodes.

b - Résultats et discussion :

L'activité in vitro de la tyrosine hydroxylase n'est pas modifiée après un traitement avec de l'amphétamine (table 8).

L'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA observée au niveau de coupes de striatum de rats prétraités avec de l'amphétamine ne peut être attribuée à un changement de conformation ou à une modification de synthèse de la tyrosine hydroxylase, puisque l'activité de cet enzyme mesurée in vitro reste inchangée. Néanmoins, dans ces expériences l'activité de la tyrosine hydroxylase a été mesurée à un temps court après l'injection d'amphétamine; il était donc peu vraisemblable que des changements de biosynthèse de l'enzyme puissent être décelés. L'activité de la tyrosine hydroxylase a été mesurée à nouveau

après des injections répétées d'amphétamine.

5 - Synthèse de ^{3}H-DA et activité in vitro de la tyrosine hydroxylase après des injections répétées d'amphétamine.

a - Protocole opératoire :

Des rats (groupes de 7 animaux) reçoivent une injection sous cutanée de sérum physiologique ou d'amphétamine (1 mg/kg) tous les jours ; 24 heures après la dernière injection les animaux sont sacrifiés. Pour chaque animal, la synthèse de ^{3}H-DA est mesurée sur un striatum, et l'activité de la tyrosine hydroxylase est évaluée sur l'autre striatum.

b - Résultats et discussion :

Après des injections répétées d'amphétamine, l'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA au niveau des coupes de striatum est toujours persistante bien que la dernière injection ait eu lieu 24 h avant la détermination de la synthèse (table 8).

Par contre l'activité in vitro de la tyrosine hydroxylase reste inchangée après un traitement répété avec de l'amphétamine (table 8). Dans ce cas, également, il est possible de dissocier les effets de l'amphétamine au niveau de l'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée in vitro ou in situ. L'inhibition induite par l'amphétamine est uniquement visible au niveau de tissus intacts et non au niveau de l'enzyme partiellement purifié. Les effets de l'amphétamine sont donc dépendants de la localisation et des structures auxquelles est associé l'enzyme. Par ailleurs, l'amphétamine n'a pas d'action directe sur l'activité de la tyrosine hydroxylase. Bagchi et Mc Geer (1964), puis Weiner et coll. (1972) ont montré que l'amphétamine (10^{-4}M) n'affecte pas l'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée au niveau d'un homogénat, ou au niveau d'une préparation enzymatique partiellement purifiée. Ces différents arguments sont donc en faveur d'un mécanisme d'action indirect de l'amphétamine intervenant dans l'inhibition de la tyrosine hydroxylase localisée dans des tissus intacts. Afin d'étayer cette hypothèse, la synthèse de ^{3}H-DA a été évaluée après l'injection de doses croissantes d'amphétamine et après addition d'amphétamine au milieu d'incubation.

TABLE 8

Effet d'une injection unique ou d'injections répétées d'amphétamine sur l'activité de la tyrosine hydroxylase, et la synthèse de ^{3}H-DA.

I - Injection unique d'amphétamine (5 mg/kg).

	Témoins	Amphétamine	% changement
^{3}H-H_2O (µCi/g/h) coupes de striatum	48,1 ± 4,5	28,7 ± 2,1 **	- 42 %
Tyrosine Hydroxylase mµmoles ^{3}H-H_2O/g/h	775 ± 40	780 ± 43	n.s

II - Injections répétées d'amphétamine (1 mg/kg par jour pendant 8 jours).

	Témoins	Amphétamine	% changement
^{3}H-H_2O (µCi/g/h) coupes de striatum	62,4 ± 2,4	50,0 ± 2,4 *	- 20 %
Tyrosine Hydroxylase mµmoles ^{3}H-H_2O/g/h	775 ± 40	760 ± 31	n.s

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

I - Injection unique d'amphétamine : l'activité de la tyrosine hydrolase et mesurée après une purification partielle de l'enzyme extrait du striatum de rats normaux ou de rats ayant reçu préalablement une injection d'amphétamine (5 mg/kg) 90 minutes avant le sacrifice. Les valeurs correspondent à la moyenne ± erreur standard, de 6 déterminations faites sur 6 striata par groupe. A titre de comparaison, les valeurs trouvées pour la synthèse de ^{3}H-DA au niveau des coupes de striatum, 90 minutes aprè une injection d'amphétamine (5 mg/kg), ont également été reportées dans cette table. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard de 8 déterminations effectuées sur 8 striata.

II - Injection répétées d'amphétamine : les rats reçoivent par jour, pendant 8 jours, 1 injection d'amphétamine (1 mg/kg) ou de sérum physiologique. Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la dernière injection. La synthèse de ^{3}H-DA est déterminée sur 1 striatum, et l'activité de la tyrosine hydroxylase est mesurée sur l'autre striatum. Les valeurs représentent la moyenne ± l'erreur standard de 7 déterminations correspondant à 7 animaux par groupe.

6 - Inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA au niveau du striatum en fonction de la dose d'amphétamine injectée.

a - Protocole opératoire :

Les rats (groupes de 3 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique ou d'amphétamine à différentes doses (0.1 ; 1 ; 5 ; 10 mg/kg), 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les coupes de striatum sont ensuite incubées en présence de ^{3}H-tyrosine pendant 15 minutes. L'eau tritiée formée est évaluée au niveau des coupes et du milieu d'incubation homogénéisés ensemble.

b - Résultats et discussion.

L'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA devient significative à partir de la dose injectée de 1 mg/kg (table 9) et paraît être maximum , puisque l'injection de quantités croissantes d'amphétamine ne renforce pas les effets de la drogue. Il faut cependant noter qu'à la dose de 0,1 mg/kg, l'inhibition de synthèse est déjà visible , mais non significative.

Les neurones dopaminergiques nigro-striataux sont donc très sensibles à l'action de l'amphétamine. Très vraisemblablement l'inhibition de synthèse induite par cette drogue fait intervenir une modification de la répartition des amines au sein des différents compartiments intraneuronaux et notamment une augmentation des concentrations de DA au niveau du "pool" de l'amine contrôlant sa propre synthèse.

7 - Synthèse de la ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum incubées en présence de d- ou de l-amphétamine.

Dans ces expériences, les effets de la d- et de la l-amphétamine ont été testés sur la synthèse de ^{3}H-DA, puisque au niveau des neurones dopaminergiques à l'inverse des neurones noradrénergiques, la stéréospécificité de l'amphétamine n'intervient pas (Coyle et Snyder, 1969 b).

a - Protocole opératoire :

Des striata de rats normaux sont prélevés, coupés et incubés

TABLE 9

Inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA en fonction de la dose d'amphétamine injectée

	$^{3}H-H_2O$ µCi/g	% changement
Témoins	12,02 ± 1,12	
Amphétamine 0,1 mg/kg	9,58 ± 0,95	- 20 %
Amphétamine 1 mg/kg	6,95 ± 0,13 *	- 42 %
Amphétamine 5 mg/kg	7,18 ± 0,52 *	- 40 %
Amphétamine 10 mg/kg	7,57 ± 0,67 *	- 37 %

* $p < 0,001$

Les rats reçoivent une injection i.p. d'amphétamine à différentes doses (0,1 ; 1 ; 5 ; 10 mg/kg) ou de liquide physiologique (témoins) 90 minutes avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés, et les coupes de striatum incubées dans 1 ml de milieu physiologique contenant 25 µCi de ^{3}H-tyrosine (56 Ci/mmole). L'$^{3}H-H_2O$ est ensuite mesurée. Les différentes valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard de 5 mesures effectuées sur 5 striata par groupe.

pendant 10 minutes dans un ml de liquide physiologique seul (témoins) ou contenant de la d-amphétamine (10^{-5}M) ou de la l-amphétamine (10^{-5}M). Après la phase de préincubation, (10 min) 25 µCi de ^{3}H-tyrosine sont ajoutés, et l'incubation se poursuit pendant 15 minutes. En fin d'incubation, les coupes et le milieu sont homogénéisés ensemble et les quantités d'$^{3}H-H_2O$ contenues dans le surnageant sont mesurées.

b - Résultats et discussion :

La d- et la l-amphétamine ajoutées au milieu d'incubation inhibent de façon équivalente la formation d'$^{3}H-H_2O$ puisque respectivement une inhibition de 35 et 28 % est retrouvée par rapport aux striata témoins (table 10).

Ces résultats montrent par ailleurs que l'amphétamine ajoutée au milieu d'incubation diminue l'activité de la tyrosine hydroxylase au niveau des coupes de striatum, de la même façon que lorsque la drogue est injectée in vivo. De plus, nous remarquons que la stéréospécificité de l'amphétamine n'intervient pas dans ces processus d'inhibition.

8 - Discussion

L'amphétamine injectée in vivo provoque des augmentations de libération de ^{3}H-DA qui sont décelables in vitro. La persistance in vitro des effets de l'amphétamine est probablement due au fait que la drogue captée par les tissus reste active physiologiquement. Nous avons par ailleurs, montré que l'amphétamine appliquée localement induit une augmentation de libération (chapitre I). Il semble que l'amphétamine augmente la libération de la DA en agissant directement au niveau des terminaisons, sans mettre en jeu de circuits neuronaux complexes.

De nombreux auteurs ont d'ailleurs suggéré que l'amphétamine augmente la libération des CA en agissant principalement au niveau des CA extragranulaires. En effet, un certain nombre d'expériences tendent à démontrer l'action de l'amphétamine au niveau de la DA non liée aux vésicules. Ainsi l'amphétamine provoque un état d'excita-

TABLE 10

Effet direct de la d- et l-amphétamine sur la synthèse de ^{3}H-DA.

	^{3}H-H_2O µCi/g	% changement
Témoins	13,30 ± 0,28	
d-amphétamine	8,65 ± 0,45 *	- 35 %
l-amphétamine	9,57 ± 0,20 *	- 28 %

* $p < .001$

variations entre d- et l-amphétamine non significatives.

Les striata de rats normaux sont prélevés, coupés et préincubés pendant 10 minutes dans 1 ml de liquide physiologique contenant soit la d- soit la l-amphétamine (10^{-5}M). 25 µCi de ^{3}H-tyrosine (56 Ci/mmole) sont ensuite ajoutés, et l'incubation se poursuit pendant 15 minutes. En fin d'incubation, les quantités de ^{3}H-H_2O formées sont mesurées. Les valeurs indiquées représentent la moyenne ± l'erreur standard, obtenue à partir de 8 déterminations par groupe.

tion beaucoup plus marqué chez des rats préalablement traités avec de la réserpine, que chez des rats non traités (Stolk et Rech, 1967, 1968). De même, Carlsson et coll., 1965, 1966 a, 1966 b, démontrent histochimiquement et biochimiquement que chez des rats dont le stock de CA a été réduit par une injection préalable de réserpine et traités avec un IMAO de façon à préserver la dégradation ultérieure des CA extravésiculaires, les concentrations de NA formée à partir de DOPA sont très diminuées après l'injection d'une faible dose d'amphétamine (1 mg/kg). Par ailleurs, Fuxe et Ungerstedt (1970) observent chez des rats prétraités avec de la réserpine dont les stocks en CA sont partiellement reconstitués par une injection d'α-méthyNA, que l'amphétamine à faible dose (1 mg/kg) produit une très nette réduction des quantités d'α-methyl NA.Ces différents résultats suggèrent que l'amphétamine favorise la libération de CA extragranulaires. Cependant, si l'amphétamine intervient uniquement en libérant les amines extragranulaires, l'inhibition de synthèse induite par l'amphémine paraît difficile à interpréter.

Au niveau du striatum du rat, la première étape de la biosynthèse de la DA est contrôlée par les concentrations intraneuronales de DA (Javoy et coll., 1972). Or, vraisemblablement la DA libre intraneuronale intervient dans le contrôle de la synthèse de l'amine, puisque la tyrosine hydroxylase est essentiellement un enzyme cytoplasmique (Musacchio 1968, Laduron et Belpaire 1968). L'amphétamine pourrait donc agir sur la synthèse de la DA, en modifiant les concentrations cytoplasmiques de l'amine.

Si comme certains auteurs l'affirment, l'amphétamine à faible dose libère l'amine extragranulaire, le mécanisme de rétroaction négatif contrôlant la synthèse de la DA doit être levé, induisant ainsi une augmentation de synthèse de la ^{3}H-DA. Cependant même à faible dose (0,1 mg/kg), l'amphétamine inhibe la synthèse de la ^{3}H-DA. Ceci nous permet de postuler que cette drogue déplace également l'amine contenue dans les vésicules vers le cytoplasme, ou au niveau du "pool" spécifique de DA contrôlant la synthèse. Le mécanisme de l'inhibition de synthèse induite par l'amphétamine devient alors analogue à celui décrit pour expliquer l'action des faux-transmetteurs ou celle de la

tyramine au niveau des neurones noradrénergiques périphériques, c'est à dire un déplacement de l'amine accumulée dans les vésicules vers le cytoplasme (Kopin et coll., 1969 ; Weiner et Selvaratnam, 1968). La dissociation des effets de l'amphétamine observés au niveau de l'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée sur une préparation enzymatique purifiée d'une part et sur des coupes de striatum d'autre part, renforce cette hypothèse.

Lorsque la tyrosine hydroxylase est "in situ", les sites actifs de l'enzyme sont disposés dans un arrangement spatial tel que les concentrations en substrat, cofacteur et produit final peuvent agir sur l'activité de l'enzyme. Inversement, lorsque l'activité de l'enzyme est mesurée "in vitro", le substrat et le cofacteur sont en concentrations saturantes. Par ailleurs, la DA est éliminée et ne peut avoir un effet rétroactif sur la synthèse.

Weiner et coll. (1972) observent également au niveau de coupes de canaux défférents, que l'amphétamine inhibe la synthèse de la NA sans affecter l'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée "in vitro". De plus, ces mêmes auteurs montrent que l'inhibition de synthèse induite par l'amphétamine est partiellement antagonisée en ajoutant le cofacteur : le $DMPH_4$ au milieu d'incubation. Or,les CA réduisent l'activité de la tyrosine hydroxylase par un mécanisme d'inhibition compétitive avec le cofacteur (Udenfriend et coll. 1965, Ikeda et coll. 1966). Les résultats montrent que l'amphétamine augmente les concentrations des CA dans le compartiment contrôlant la synthèse.

Dans le cas des neurones dopaminergiques, il est également très vraisemblable que l'amphétamine mobilise la DA d'un compartiment de stockage intragranulaire vers le cytoplasme. Cette drogue pourrait réduire l'activité de la tyrosine hydroxylase "in situ" au niveau du striatum, en augmentant l'inhibition par rétroaction.

III - ETUDE COMPARATIVE DES EFFETS DE DEUX NEUROLEPTIQUES : LA RESERPINE ET LA THIOPROPERAZINE SUR LA SYNTHESE ET LA LIBERATION DE LA ^{3}H-DA.

Dans la seconde partie de ce travail, la synthèse de la ^{3}H-DA et l'activité "in vitro" de la tyrosine hydroxylase ont tout d'abord été mesurées afin d'étudier les mécanismes mis en jeu lors des modifications du métabolisme de la DA induites par deux neuroleptiques de type bien distinct : la réserpine et la thiopropérazine. Ensuite nous avons analysé les effets de ces drogues au niveau des processus de libération de la ^{3}H-DA.

1 - Synthèse de la ^{3}H-DA et activité "in vitro" de la tyrosine hydroxylase après une injection unique de réserpine ou de thioproperazine.

a - Protocole expérimental.

Les rats reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique, de thiopropérazine (5 mg/kg, 3h) ou de réserpine (Serpasil$^{(R)}$ 5 mg/kg, 24 h avant le sacrifice). Les striata sont prélevés, coupés et incubés pendant différents temps dans 1 ml de liquide physiologique contenant de la ^{3}H-tyrosine. A la fin de l'incubation, les coupes et le milieu sont homogénéisées ensemble et les quantités d'^{3}H-H_2O formées sont mesurées.

Dans une expérience complémentaire, les coupes sont séparées du milieu d'incubation, et les quantités de ^{3}H-tyrosine accumulées dans les tissus sont déterminées. Par ailleurs, l'activité de la tyrosine hydroxylase a été mesurée "in vitro" après purification partielle de l'enzyme extrait de striatum de rats prétraités avec de la thiopropérazine (5 mg/kg ip 3h), ou de la réserpine (5 mg/kg, 24h).

b - Résultats.

Les deux neuroleptiques étudiés induisent des effets opposés au niveau de la transformation de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA : la formation d'^{3}H-H_2O est réduite après une injection de réserpine alors qu'elle est augmentée après une injection de TZ. La diminution de formation d'^{3}H-H_2O obtenue 24h après un prétraitement des animaux avec de la réserpine est sensiblement identique au deux temps d'incu-

bation examinés (- 37 et - 39 %) (table 11). Par contre, après prétraitement des animaux avec de la TZ, les quantités d'^{3}H-H_2O formées sont très augmentées pendant les 15 premières minutes d'incubation (+70 %), alors qu'entre 15 et 30 minutes d'incubation la vitesse de transformation de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA ne semble plus accélérée (table 12). En effet, en mesurant les quantités d'^{3}H-H_2O formées à la fin d'une période d'incubation de 30 minutes, l'action de la TZ est masquée puisque dans ce cas la formation d'^{3}H-H_2O est augmentée de 30 % seulement (table 12) par rapport à la valeur trouvée chez les animaux témoins. Par ailleurs, l'accumulation de ^{3}H-tyrosine n'est pas significativement modifiée au niveau des coupes de striatum de rats prétraités avec de la réserpine (table 13). Inversement, le prétraitement des animaux avec de la TZ induit simultanément une réduction de l'accumulation de ^{3}H-tyrosine et des taux de tyrosine endogène mais ne provoque pas de modification de l'activité spécifique de la tyrosine. Celle-ci reste en effet identique à celle retrouvée au niveau des coupes de striatum des animaux témoins (table 13).

L'activité de la tyrosine hydroxylase est inchangée lorsqu'elle est mesurée "in vitro" sur une préparation enzymatique partiellement purifiée obtenue à partir de striatum de rats prétraités avec de la TZ ou de la réserpine (table 14).

c - Discussion.

La réserpine et la thiopropérazine n'induisent pas de modification d'accumulation de la ^{3}H-tyrosine ou de changement d'activité spécifique de la tyrosine. Il est donc vraisemblable, que les changements de formation d'^{3}H-H_2O observés après prétraitement des animaux avec de la réserpine ou de la TZ correspondent respectivement à une inhibition et à une activation de la synthèse de ^{3}H-DA. L'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA obtenue après une injection de réserpine n'est pas accompagnée d'un changement de l'activité "in vitro" de la tyrosine hydroxylase. Or la réserpine empêche le stockage des CA au niveau des vésicules (Maynert et Kuriyama, 1964 ; Carlsson et coll., 1963). Par conséquent l'inhibition de la synthèse de la ^{3}H-DA peut résulter d'une augmentation des taux de DA cytoplasmique induisant par rétroaction une inhibition de l'activité de la tyrosine hydroxylase. Weiner et coll. (1972) observent également après une in-

TABLE 11

Effets de la réserpine sur le taux de conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA.

$^{3}H-H_2O$ formée (µCi/g de tissu)		
Temps d'incubation	15 minutes	30 minutes
Témoins	10,8 ± 1,0	20,9 ± 2,6
Réserpine	7,6 ± 1,0 *	14,8 ± 0,7 *
% changement	- 30	- 29

Taux de conversion de ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA $^{3}H-H_2O$ (µCi/g/h)			
Interval de temps utilisé	0-15 minutes	0-30 minutes	15-30 minutes
Témoins	43,2 ± 4,0	41,8 ± 5,2	40,4 ± 4,9
Réserpine	30,4 ± 4,0 *	29,6 ± 1,4 *	28,8 ± 3,8 *
% changement	- 30	- 29	- 29

* $p < 0,001$

Les rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. de liquide physiologique ou de réserpine (5 mg/kg) 24 heures avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés et incubés pendant deux temps différents (15 et 30 min.). A la fin de l'incubation, les coupes et le milieu sont homogénéisés ensemble et les quantités d'$^{3}H-H_2O$ formées sont mesurées. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne ob-

tenue avec 8 échantillons ± l'erreur standard. Le taux de conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA est calculé à partir des quantités d'^{3}H-H_2O formées pendant 15 ou 30 minutes, et par ailleurs en effectuant la différence entre les quantités accumulées à 15 et à 30 minutes.

TABLE 12

Effets de la thiopropérazine sur le taux de conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA .

$^{3}H-H_2O$ formée (µCi/g de tissu)		
Temps d'incubation	15 minutes	30 minutes
Témoins	12,0 ± 1,1	24,7 ± 1,6
Thiopropérazine	20,3 ± 1,3 **	31,9 ± 0,6 *
% changement	+ 69	+ 29

Taux de conversion de ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA $^{3}H-H_2O$ (µCi /g/h)			
Interval de temps utilisé	0-15 minutes	0-30 minutes	15-30 minutes
Témoins	48 ± 4	49 ± 3	51 ± 6
Thiopropérazine	81 ± 5 **	64 ± 1 *	46 ± 2
% changement	+ 70	+ 29	n.s

** $p < 0,001$ * $p < 0,01$

Les rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. de liquide physiologique ou de thioprotérazine (5 mg/kg) 3 heures avant d'être sacrifiés. Les striata sont incubés pendant deux temps différents (15 et 30 minutes). Les coupes et le milieu sont homogénéisés ensemble à la fin de l'incubation, et les quantités d'$^{3}H-H_2O$ formées sont mesurées. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue avec

8 échantillons ± l'erreur standard. Les taux de conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA sont calculés à partir des quantités d'^{3}H-H_2O formées pendant 15 ou 30 minutes et en effectuant la différence entre les quantités accumulées à 15 et à 30 minutes.

TABLE 13

Effet de la thiopropérazine et de la réserpine sur l'activité spécifique de la tyrosine.

Expérience I	Témoins	Réserpine
^{3}H-tyrosine µCi/g	49,4 ± 3,2	47,5 ± 4,5

Expérience II	Témoins	Thiopropérazine
^{3}H-tyrosine µCi/g	50,3 ± 3,5	42,2 ± 4,2
tyrosine µg/g	20,3 ± 1,2	16,8 ± 1,1 *
A.S. de la tyrosine	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,4

* $p < 0,001$

Les rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. de liquide physiologique, ou de réserpine (5 mg/kg - 24h) ou de thiopropérazine (5 mg/kg - 3h). Les striata sont prélevés, incubés pendant 15 minutes dans 1 ml. de liquide physiologique contenant 25 µCi de ^{3}H-tyrosine. En fin d'incubation, les coupes sont séparées des milieux d'incubation, et la ^{3}H-tyrosine accumulée au niveau des coupes est mesurée. Dans le cas des animaux prétraités avec de la TZ, la tyrosine endogène est déterminée au niveau des striata non incubés. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue à partir de 8 échantillons ± l'erreur standard.

TABLE 14

Activité de la tyrosine hydroxylase in vitro après prétraitement des animaux avec de la réserpine ou de la thiopropérazine.

$^3H-H_2O$ formée mmoles/g/heure			
	Témoins	Traités	% changement
Réserpine	1243 ± 36	1258 ± 70	n.s.
Thiopropérazine	1132 ± 32	1179 ± 59	n.s.

Les rats (groupes de 6 animaux) reçoivent une injection i.p. de liquide physiologique ou de réserpine (5 mg/kg - 24h) ou de thiopropérazine (5 mg/kg - 3h). Les animaux sont décapités et les striata sont prélevés. La tyrosine hydroxylase, extraite des striata groupés par 2, est ensuite partiellement purifiée. L'activité est déterminée en mmoles d'$^3H-H_2O$ formées par g. de striatum. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne de 8 déterminations ± l'erreur standard.

jection de réserpine une inhibition de la synthèse des CA au niveau des canaux déférents, sans modification de l'activité de la tyrosine hydroxylase in vitro.

L'augmentation de synthèse de la ^{3}H-DA obtenue après prétraitement des animaux avec de la TZ est assez complexe, puisque d'une part les quantités d'^{3}H-H_2O n'augmentent pas proportionnellement pendant toute la durée d'une incubation de 30 minutes et d'autre part l'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée in vitro est inchangée. L'activation du métabolisme de la DA striatale induite in vivo par les neuroleptiques du type des phénothiazines ou des butyrophénones (Nybäck et Sedval, 1970 ; Nybäck, 1971) est attribuée à une activation indirecte des neurones nigro-striataux (Anden et coll., 1970 a, 1971) entretenue par un mécanisme de rétroaction intervenant pour compenser le bloquage des récepteurs dopaminergiques. Carlsson et Lindqvist (1963) émettent en premier cette hypothèse afin d'interpréter l'augmentation des métabolites des CA cérébrales induite par une injection de chlorpromazine. Le résultat nouveau obtenu au cours de cette étude réside dans le fait que l'activation des neurones dopaminergiques nigro-striataux induite in vivo est toujours décelable in vitro. Ceci implique que l'activité neuronale persiste pendant un certain temps dans ces conditions expérimentales. En effet, l'activation de la synthèse de la ^{3}H-DA est très marquée pendant les 15 premières minutes de l'incubation puis s'estompe.

Les modifications de synthèse observées après traitement des animaux avec la TZ ou la réserpine ne sont pas provoquées par des changements de l'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée in vitro. Vraisemblablement des mécanismes de régulation rapide interviennent, mettant en jeu les concentrations de cofacteur ou de DA au niveau des sites intraneuronaux de la transformation de la tyrosine en DOPA.

2 - Synthèse de la ^{3}H-DA et activité in vitro de la tyrosine hydroxylase après des injections répétées de réserpine ou de thiopropérazine.

L'analyse des effets d'injections répétées de réserpine ou de TZ a été réalisée afin de déterminer si des régulations à plus long terme peuvent intervenir au niveau de l'activité de la tyrosine hydroxylase.

a - Protocole opératoire.

Les animaux (groupes de 7 animaux) reçoivent une fois par jour pendant 8 jours une injection sous cutanée de réserpine (0,5 mg/kg) ou de TZ (1,6 mg/kg). Les animaux sont tués par décapitation 24 heures après la dernière injection, la synthèse de la ^{3}H-DA et l'activité de la tyrosine hydroxylase sont estimées sur le même animal.

La synthèse de la ^{3}H-DA est immédiatement déterminée au niveau des coupes provenant d'un seul striatum. L'autre striatum est également prélevé, pesé, puis gardé au congélateur à - 17°C jusqu'à la détermination de l'activité in vitro de la tyrosine hydroxylase. Dans une expérience complémentaire, les coupes ont été séparées du milieu d'incubation, afin de déterminer l'activité spécifique de la tyrosine après ces différents traitements pharmacologiques.

b - Résultats.

Les injections répétées avec de la réserpine (0,5 mg/kg) induisent au niveau du striatum une diminution de la formation d'^{3}H-H_2O de - 28 % (table 15). De façon surprenante la formation d'^{3}H-H_2O est diminuée (-22 %) (table 15) 24 heures après la dernière injection d'un traitement répété avec de la TZ. Par ailleurs, l'activité spécifique de la tyrosine déterminée dans une série d'expériences complémentaires après séparation des coupes du milieu d'incubation n'est pas modifiée après ces différents traitements pharmacologiques (table 16). De même malgré les injections répétées avec l'un ou l'autre de ces neuroleptiques, l'activité de la tyrosine hydroxylase, mesurée in vitro est inchangée (table 15).

c - Discussion.

L'activité spécifique de la tyrosine est inchangée après les différents traitements ; par conséquent la réduction de formation d'^{3}H-H_2O observée après l'administration répétée de réserpine ou de TZ correspond à une inhibition de la synthèse de ^{3}H-DA. Par ailleurs, l'activité de la tyrosine hydroxylase déterminée in vitro n'est pas modifiée. Donc vraisemblablement les modifications de synthèse obser-

TABLE 15

Effets d'injections répétées de réserpine et de thiopropérazine sur le taux de conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA au niveau de coupes et sur l'activité de la tyrosine hydroxylase.

	Coupes		Tyrosine hydroxylase	
	$^{3}H-H_2O$ µCi/g/h	% changement	$^{3}H-H_2O$ mmoles/g/h	% changement
Liquide Physiologique	62,4 ± 2,4		775 ± 40	
Réserpine	44,8 ± 3,2	- 28 **	826 ± 48	n.s.
Thiopropérazine	49,6 ± 5,6	- 21 *	727 ± 55	n.s.

** $p < 0,001$ * $p < 0,05$

Les rats (groupes de 7 animaux) reçoivent une fois par jour pendant 8 jours une injection sous cutanée de liquide physiologique ou de réserpine (0,5 mg/kg) ou de thiopropérazine (1,6 mg/kg). 24 heures après la dernière injection, les animaux sont tués. L'un des striatum sert à la détermination de la synthèse de la ^{3}H-DA au niveau des coupes, l'autre à la mesure de l'activité de la tyrosine hydroxylase. Dans les deux cas, l'$^{3}H-H_2O$ formée lors de l'hydroxylation de la L- 3,5 ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA est mesurée. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue à partir de 7 échantillons ± l'erreur standard.

TABLE 16

Effets d'injections répétées de thiopropérazine et de réserpine sur l'activité spécifique de la tyrosine mesurée sur des coupes de striatum de rats.

	Témoins	Réserpine	Thiopropérazine
^{3}H-tyrosine µCi/g	57 ± 4	61 ± 3	61 ± 3
Tyrosine µg/g	9,0 ± 0,5	8,6 ± 0,3	7,8 ± 0,5
A.S de la tyrosine µCi/µg	7,0 ± 0,4	7,1 ± 0,2	7,5 ± 0,3

Des rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une fois par jour pendant 8 jours, une injection sous cutanée de liquide physiologique ou de réserpine (0,5 mg/kg) ou de thiopropérazine (1,6 mg/kg). 24 heures après la dernière injection, les animaux sont décapités, et les striata sont prélevés, coupés en tranches (0,2 mm) et incubés pendant 15 minutes dans 1 ml. de liquide physiologique contenant de la ^{3}H-tyrosine (25 µCi). A la fin de l'incubation, les coupes sont séparées du milieu d'incubation par filtration, homogénéisées, et la tyrosine endogène et la ^{3}H-tyrosine sont mesurées. Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue avec 8 striata ± l'erreur standard.

vées au niveau des coupes sont dépendantes de facteurs contrôlant l'activité de la tyrosine hydroxylase "in situ" tels que les concentrations intraneuronales en cofacteurs ou en DA.

L'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA observée après des injections répétées de réserpine est moins importante que celle détectée après une injection unique ; ceci peut être attribuée aux différences de protocole utilisé. En effet, la dose de réserpine injectée chaque jour est dix fois plus faible que la dose injectée dans l'expérience aigue.

L'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA observée 24 heures après la dernière injection du traitement répété avec de la TZ révèle l'existence d'un nouveau processus de régulation qui entraîne une réduction de la synthèse de ^{3}H-DA. Ici encore le changement d'activité des neurones nigro-striataux n'est pas accompagné de modifications d'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée in vitro.

3 - Effets de la réserpine et de la thiopropérazine sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA.

Les effets induits par ces deux neuroleptiques sont étudiés après une injection unique de la drogue. Les effets de la réserpine sont analysés à deux temps différents après l'injection : d'une part à un moment où la drogue provoque un état sédatif et cataleptique très marqué (2 heures après l'injection) et d'autre part à un moment où les animaux ont pratiquement récupéré un comportement normal (48 h. après l'injection).

a - Protocole opératoire.

Dans une série d'expériences, les rats reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique ou de réserpine (Serpasil$^{(R)}$ 5 mg/kg) 2 heures ou 48 heures avant d'être sacrifiés. Dans une autre série expérimentale, les rats reçoivent du sérum physiologique ou de la thiopropérazine (5 mg/kg) 3 heures avant d'être sacrifiés. Les striata sont coupés et incubés pendant 15 minutes dans 1 ml. de liquide physiologique contenant de la ^{3}H-tyrosine. Les coupes sont séparées des milieux d'incubation. La ^{3}H-DA libérée dans les liquides d'incubation et accumulée dans les tissus est mesurée . Les quantités de

^{3}H-tyrosine accumulées dans les coupes sont également déterminées. Dans des expériences complémentaires, les quantités totales de ^{3}H-H_2O formées et de ^{3}H-DA accumulées sont mesurées après avoir homogénéisé ensemble les coupes et les milieux d'incubation.

Par ailleurs, la DA endogène est dosée sur des striata n'ayant pas été incubés.

b - Résultats.

Le prétraitement des animaux avec de la TZ induit une augmentation de la libération de ^{3}H-DA (+ 49 %) qui est accompagnée d'un accroissement de l'accumulation de la ^{3}H-DA au niveau des coupes(+46%) (table 17) et d'une activation de la vitesse de formation de l'^{3}H-H_2O (+ 70 %) (table 18). Cette activation générale du métabolisme de la DA entraîne une réduction des taux de la DA endogène (- 26 %) (table 19).

Inversement, le prétraitement des animaux avec de la réserpine induit aux deux temps examinés (2 heures et 48 heures) une diminution de la libération (table 17) de la ^{3}H-DA (- 41 et - 32 %) et de sa synthèse (table 18) (- 45 et - 38 %). Une réduction considérable de l'accumulation de la ^{3}H-DA (- 92 %) (table 17) ainsi que des taux de DA endogène (- 96 %) (table 19) est observée 2 heures après l'injection de réserpine. L'accumulation de la ^{3}H-DA et les taux de DA endogène augmentent à nouveau très progressivement 48 heures après l'injection puisqu'ils représentent respectivement 35 % (table 17) et 16 % (table 19) des valeurs obtenues chez les animaux témoins.

c - Discussion.

Les deux neuroleptiques étudiés ont des effets opposés sur la libération, l'accumulation et la synthèse de la ^{3}H-DA. La comparaison de ces résultats donnent d'autre part des renseignements intéressants sur le métabolisme de la DA au niveau du néostriatum.

Le prétraitement des animaux avec de la TZ induit une activation des neurones nigro-striataux ce qui porvoque un accroissement des quantités de ^{3}H-DA libérées. Cette activation se traduit également par une augmentation parallèle de la synthèse et de l'accumu-

lation de la ^{3}H-DA. Ces résultats reflètent un accroissement de la vitesse de renouvellement de la DA, consécutif à l'utilisation accrue de l'amine. Cependant l'utilisation de la DA n'est pas totalement compensée par l'augmentation de synthèse puisque les concentrations tissulaires de DA sont diminuées chez les animaux traités avec de la TZ.

Chez les animaux prétraités avec de la réserpine, plusieurs processus concourent à réduire la libération de DA au niveau du néostriatum : d'une part la synthèse de la ^{3}H-DA est inhibée, d'autre part la dégradation de l'amine nouvellement synthétisée est très importante. Deux heures après l'injection de la réserpine, la synthèse de la ^{3}H-DA est inhibée de 55 % et pratiquement toute la ^{3}H-DA formée est dégradée. En effet, les quantités de ^{3}H-DA accumulées ne représentent plus que 6 % des quantités de ^{3}H-DA formées réellement. Les taux de DA sont également très diminués. Ces résultats rendent compte de l'action de la réserpine qui en empêchant la capture de la DA au niveau des sites de stockage (Dahlström et coll., 1965) favorise la dégradation de l'amine par la MAO (Youdim et Sandler, 1968). La ^{3}H-DA ne peut s'accumuler et n'est plus libérée.

La synthèse de la ^{3}H-DA est encore inhibée (- 38 %) 48 heures après l'injection de réserpine. Cependant la dégradation de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée est moins importante (50 % de la ^{3}H-DA réellement formée) et parallèlement les taux de DA augmentent. Ces résultats indiquent une récupération très progressive des capacités de stockage de la DA au niveau des terminaisons dopaminergiques du néostriatum. La libération de la ^{3}H-DA reste cependant très diminuée 48 heures après l'injection de la drogue malgré l'augmentation significative de l'accumulation de la ^{3}H-DA au niveau des coupes de striatum par rapport à celle obtenue 2 heures après l'injection. Ce résultat est peut être attribuable à un défaut de la sensibilité de notre méthode de mesure des très faibles quantités de ^{3}H-DA libérées dans les milieux d'incubation particulièrement riches en ^{3}H-tyrosine.

4 - <u>Etudes complémentaires de certains effets provoqués par la thiopropérazine</u>.

Nous avons pu remarquer que les effets de la TZ sont complexes,

TABLE 17

Effets de la réserpine et de la thiopropérazine sur la libération et l'accumulation de ^{3}H-DA.

Expérience I	Tissus ^{3}H-DA (mμCi/g)	LCR ^{3}H-DA (mμCi/g)	Tissus ^{3}H-tyrosine (μCi/g)
Témoins	8450 ± 694	120 ± 8	40,0 ± 1,5
Réserpine - 2h -	671 ± 73 ** (- 92 %)	70 ± 8 * (-41 %)	35,6 ± 1,2
Réserpine - 48h -	2985 ± 216 ** (- 65 %)	81 ± 8 * (- 32 %)	40,8 ± 1,4

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

Expérience II	Tissus ^{3}H-DA (mμCi/g)	LCR ^{3}H-DA (muCi/g)
Témoins	3650 ± 430	280 ± 30
Thiopropérazine	4900 ± 500 • (+ 46 %)	420 ± 30 •• (+49 %)

• $p < 0,05$ •• $p < 0,01$

Légende table 17

Expérience I.

Les rats (groupes de 5 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique ou de réserpine (5 mg/kg) 2 heures ou 48 heures avant d'être sacrifiés. Les striata sont coupés, incubés pendant 15 minutes dans 1 ml. de liquide physiologique contenant 25 µCi de ^{3}H-tyrosine (58 Ci/mmole).

Expérience II.

Les rats (groupes de 3 animaux) reçoivent une injection i.p. de sérum physiologique ou de thiopropérazine (5 mg/kg) 3 heures avant d'être sacrifiés. Les striata sont coupés, incubés pendant 15 minutes dans 1 ml de liquide physiologique contenant 25 µCi de ^{3}H-Tyrosine (28,2 Ci/mmole).

En fin d'incubation, les coupes sont séparées des milieux d'incubation soit par filtration (expérience I) soit par centrifugation (expérience II). La ^{3}H-DA est mesurée dans les coupes et les milieux d'incubation. Les valeurs représentent la moyenne obtenue avec 10 échantillons (expérience I) ou 6 échantillons (expérience II) $\pm$ l'erreur standard.

TABLE 18

Effets de la thiopropérazine et de la réserpine sur la synthèse et l'accumulation de ^{3}H-DA.

Expérience I.

	^{3}H-H_2O mμCi/g	^{3}H-DA mμCi/g	$\frac{^{3}H\text{-DA}}{^{3}H\text{-}H_2O}$ %
Témoins	12046 ± 780	8926 ± 650	74 %
Réserpine 2h	6630 ± 476 * (- 45 %)	395 ± 31 * (- 97 %)	6 %
Réserpine 48h	7454 ± 260 * (- 38 %)	3880 ± 247 * (-57 %)	52 %

Expérience II.

Témoins	12017 ± 1117	10206 ± 992	85 %
Thiopropérazine	20316 ± 1350 * (+ 69 %)	17433 ± 400 * (+ 71 %)	86 %

* $p < 0,001$

Les rats (groupes de 4 animaux) reçoivent une injection i.p. le matin soit de réserpine (5 mg/kg) 2h ou 48h avant d'être sacrifiés, soit de thiopropérazine (5 mg/kg) 3h avant d'être sacrifiés.
Les striata sont prélevés, coupés (coupes 300μ) et incubés pendant 15 minutes dans 1 ml de liquide physiologique contenant 25 μCi de ^{3}H-tyrosine (58 Ci/mmole). L'ensemble, coupes et milieu d'incubation, est homogénéisé ; l'^{3}H-H_2O et la ^{3}H-DA sont mesurées.
Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard de 8 échantillons.

TABLE 19

Effets d'un prétraitement avec de la thiopropérazine ou de la réserpine sur les taux de DA endogène du striatum.

	DA (µg/g)		
	Témoins	Traités	% changement
Thiopropérazine	7,80 ± 0,50	5,80 ± 0,30 *	- 26 %
Réserpine 2h	7,85 ± 0,31	0,25 ± 0,04 **	- 97 %
Réserpine 48 h	7,85 ± 0,31	1,23 ± 0,05 **	- 84 %

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$

Les rats (groupes de 6 animaux) reçoivent une injection i.p. soit de sérum physiologique, soit de thiopropérazine (5 mg/kg - 3h), soit de réserpine(Serpasil$^{(R)}$ 5 mg/kg - 2h ou 48h) avant d'être sacrifiés. Les striata sont prélevés, homogénéisés par paire, et la DA endogène est dosée par spectrofluorimétrie.
Les résultats correspondent à la moyenne de 6 échantillons ± l'erreur standard.

puisque la synthèse de la ^{3}H-DA peut être activée ou inhibée selon la durée du traitement avec cette drogue. Cependant, il semble généralement admis que l'augmentation de synthèse et de libération de la ^{3}H-DA observée après une injection unique de TZ résulte d'une activation inter-neuronale des neurones nigro-striataux. Nous avons essayé de confirmer cette hypothèse d'une part en mesurant la synthèse de ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum incubées en présence de TZ, et d'autre part en analysant les effets de la TZ au niveau du striatum de rats prétraités avec de l'amphétamine puisque les neuroleptiques du groupe des phénothiazines bloquent l'effet comportemental induit par l'amphétamine (Randrup et Munkvad, 1965).

a - Synthèse de ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum incubées en présence de thiopropérazine.

1 - Protocole expérimental.

Des striata (groupes de 6 échantillons) provenant de rats témoins sont coupés, puis incubés en présence de ^{3}H-tyrosine. La TZ est ajoutée au milieu d'incubation à différentes concentrations : 10^{-7} ; 10^{-6} et 10^{-5} M. Après 15 minutes d'incubation, les coupes et les milieux d'incubation sont homogénéisées ensemble et les quantités d'^{3}H-H_2O formées sont déterminées sur le surnageant.

2 - Résultats et discussion.

La formation d'^{3}H-H_2O n'est pas modifiée par la TZ ajoutée dans le milieu d'incubation aux trois concentrations examinées (table 20). La TZ ne semble donc pas activer directement le métabolisme de la DA. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une activation indirecte des neurones dopaminergiques par la TZ. L'augmentation de synthèse et de libération de la ^{3}H-DA observée précédemment in vitro au niveau des terminaisons dopaminergiques déconnectées des afférences striatales, résulte vraisemblablement d'une persistance de l'activation neuronale induite indirectement in vivo par la TZ.

b - Effet d'un traitement avec de la thiopropérazine sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA au niveau du striatum chez le rat prétraité avec de l'amphétamine.

TABLE 20

Synthèse de la ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum incubées en présence de thiopropérazine.

	$^{3}H-H_2O$ µCi/g/15 minutes	%
Témoins	9,9 ± 1,2	
TZ 10^{-7}M	9,7 ± 0,6	98 n.s
TZ 10^{-6}M	11,4 ± 1,2	115 n.s
TZ 10^{-5}M	9,3 ± 0,6	94 n.s

Des coupes de striatum de rats normaux sont incubées pendant 15 minutes, en présence de différentes concentrations de TZ (10^{-7}, 10^{-6} et 10^{-5}M) , dans 1 ml de liquide physiologique contenant 25 µCi de ^{3}H-tyrosine (56 Ci/mmole). A la fin de l'incubation, les coupes sont homogénéisées avec le milieu d'incubation, et l'$^{3}H-H_2O$ est mesurée. Les valeurs obtenues représentent la moyenne de 6 déterminations ± l'erreur standard.

1 - Protocole opératoire.

3 groupes de rats sont utilisés. Un groupe reçoit une injection i.p. de sérum physiologique, un autre groupe reçoit une injection i.p. d'amphétamine (5 mg/kg) 90 minutes avant d'être sacrifié. Le troisième groupe reçoit une injection i.p. d'amphétamine (5mg/kg), 60 minutes plus tard une injection i.p. de TZ (5 mg/kg) et est sacrifié 30 minutes après la dernière injection. Les striata sont prélevés, incubés en présence de ^{3}H-tyrosine dans 1 ml de liquide physiologique. Après 15 minutes d'incubation, les coupes sont séparées du milieu d'incubation par centrifugation. La ^{3}H-DA est mesurée dans les tissus, et dans les milieux d'incubation.

2 - Résultats.

L'effet comportemental provoqué par l'amphétamine est inhibé environ 10 minutes après l'injection de TZ. Les effets biochimiques qui accompagnent cet effet pharmacologique sont assez surprenants(fig. 18). D'une part, la TZ renverse les effets de l'amphétamine au niveau de la synthèse de la ^{3}H-DA : les quantités de ^{3}H-DA accumulées dans les coupes de striatum de rats prétraités avec les deux drogues sont significativement augmentées par rapport aux quantités de ^{3}H-DA accumulées dans les striata de rats prétraités uniquement avec de l'amphétamine. D'autre part, la TZ potentialise considérablement les effets de l'amphétamine au niveau de la libération de la ^{3}H-DA : les quantités de ^{3}H-DA libérées sont deux fois plus importantes que celles libérées au niveau des striata de rats prétraités uniquement avec de l'amphétamine.

3 - Discussion.

L'effet comportemental induit par l'amphétamine est supprimé par la TZ et cependant les quantités de ^{3}H-DA libérées sont très importantes. Ces résultats rendent compte du bloquage des récepteurs dopaminergiques par la TZ. Cette drogue d'autre part lève l'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA induite par l'amphétamine. Cet effet peut résulter de l'augmentation de la libération de la DA induite par la TZ, entraînant une réduction des concentrations de l'amine au niveau du compartiment intracellulaire impliqué dans le contrôle de la synthèse.

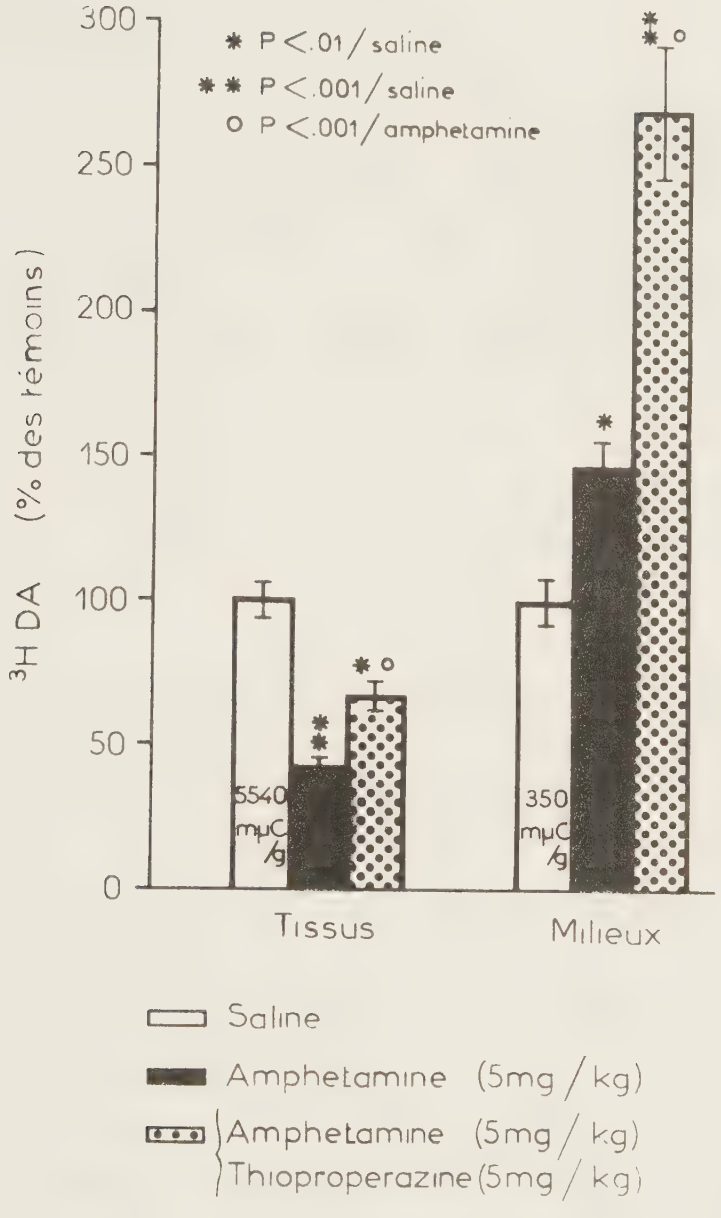


Fig. 18 : Modifications de l'accumulation et de la libération de la ^{3}H-DA au niveau de coupes de striatum de rat préalablement traités avec de l'amphétamine.

Des groupes de rats reçoivent une injection i.p. de liquide physiologique, d'amphétamine (5 mg/kg - 90 min.) ou d'amphétamine (5 mg/kg) et 60 min. plus tard de thiopropérazine (5 mg/kg). Les striata sont coupés et incubés avec de la ^{3}H-tyrosine (25 μCi) pendant 15 min. La ^{3}H-DA est mesurée dans les coupes et dans les milieux d'incubation. Les résultats correspondent à la valeur moyenne obtenue avec 8 échantillons $\pm$ l'erreur standard. Les chiffres représentent les valeurs absolues de ^{3}H-DA mesurée en mμCi/g chez les animaux témoins.

D'autres interprétations sont également possibles. En effet, Kehr et coll. (1972) émettent l'hypothèse que des récepteurs dopaminergiques présynaptiques contrôlent la libération et la synthèse de la DA. Si un tel mécanisme existe, il est possible que chez des animaux prétraités avec de l'amphétamine cette nouvelle régulation soit mise en jeu afin de prévenir une libération trop importante de la DA. La TZ, en bloquant les récepteurs présynaptiques stimulés par la DA libérée en grande quantité sous l'effet de l'amphétamine, pourrait lever l'inhibition exercée à ce niveau.

B - Discussion.

L'étude de la libération et de la synthèse de la ^{3}H-DA au niveau du striatum du rat nous a conduit à analyser les mécanismes d'action de deux neuroleptiques : la thiopropérazine et la réserpine, particulièrement actifs sur le métabolisme de la DA.
Des résultats intéressants ressortent de cette étude.

a - Effets induits par la TZ.

1 - La TZ n'agit pas directement au niveau des neurones dopaminergiques puisque cette drogue ajoutée au liquide d'incubation ou de superfusion (chapitre I) ne modifie pas la synthèse ou la libération de la ^{3}H-DA. L'utilisation de la DA n'est d'ailleurs pas augmentée in vivo après une injection de chlorpromazine lorsque la voie nigro-striatale est lésée peu de temps avant l'injection du neuroleptique (Anden et coll., 1971). L'activation du métabolisme de la DA induite par les neuroleptiques du type des phénothiazines ou des butyrophénones, est une activation inter-neuronale (Carlsson et Lindqvist, 1963) qui tendrait à compenser le bloquage des récepteurs dopaminergiques induit par ces drogues (Bradley et coll., 1966 ; Van Rossum, 1966). Cependant un effet direct de la TZ au niveau de récepteurs présynaptiques peut être envisagé lorsque une augmentation de la libération de la DA est provoquée par certaines drogues comme l'amphétamine.

2 - L'activation des neurones nigro-striataux induite "in vivo" par la TZ persiste "in vitro". Cependant ce processus est observé pendant une période relativement courte. En effet, nous avons re-

marqué que la vitesse de synthèse de la ^{3}H-DA est principalement activée pendant les 15 premières minutes de l'incubation. D'ailleurs, Javoy et coll. (1970) observent in vivo une augmentation très importante de l'accumulation de la ^{3}H-DA après une injection de ^{3}H-tyrosine dans le striatum de rats prétraités avec de la TZ et ceci malgré la dégradation non négligeable de l'amine nouvellement synthétisée. Le phénomène apparaît donc plus amplifié in vivo. D'autre part, l'activation du métabolisme de la DA se généralise dans tout le neurone puisque l'accumulation de la ^{3}H-DA est également augmentée dans les corps cellulaires (Javoy et coll., 1970). Il est donc intéressant de noter que l'activation interneuronale des neurones dopaminergiques peut persister in vitro, alors que le striatum est déconnecté de toutes les afférences.

3 - L'activation des neurones dopaminergiques induite in vivo après injection de TZ et observée in vitro en incubant des coupes de striatum en présence de ^{3}H-tyrosine, se traduit par une augmentation de la libération et de la synthèse de la ^{3}H-DA. L'augmentation de synthèse de l'amine, démontrée sans ambiguité grâce à la méthode de mesure de l'$^{3}H-H_2O$, n'est cependant pas concomittante d'une stimulation de l'activité de la tyrosine hydroxylase comme l'indiquent les résultats obtenus avec l'enzyme partiellement purifié. Des régulations intraneuronales doivent être mises en jeu. En effet, l'activation des neurones nigro-striataux augmente la libération de la DA et parallèlement diminue les taux de DA endogène. Ces différents processus contribuent à diminuer les concentrations de DA au niveau du compartiment contrôlant la synthèse de l'amine, et par conséquent à lever l'inhibition par rétroaction.

4 - L'injection répétée de TZ provoque un nouveau mécanisme de régulation qui tend à réduire l'activité de base des neurones dopaminergiques. La synthèse de la DA est diminuée 24 heures après la dernière injection d'un traitement répété avec de la thiopropérazine. Ce processus de régulation n'est pas visible 24 heures après une injection unique de TZ (Scatton et coll., 1973). Ce nouveau mécanisme de régulation qui peut avoir des implications cliniques importantes, puisque les neuroleptiques sont généralement actifs après des adminis-

trations répétées, reste cependant à élucider.

b - Effets induits par la réserpine.

1 - La réserpine empêche l'incorporation de la DA au niveau des vésicules, et de ce fait l'amine qui n'est plus protégée est rapidement dégradée. Les taux de DA diminuent donc considérablement. L'activité de la tyrosine hydroxylase mesurée in vitro sur l'enzyme purifié reste inchangée après traitement des animaux avec cette drogue. Par conséquent, l'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA observée au niveau des coupes peut résulter de l'augmentation des taux de la DA cytoplasmique au niveau des terminaisons dopaminergiques.

2 - Une dissociation entre la durée de l'effet pharmacologique de la réserpine et la durée de la baisse des CA cérébrales a pu être observée. Cet effet étudié par différents auteurs (Haggendal et Lindqvist, 1963, 1964 ; Glowinski et coll., 1966 b ; Dahlström et coll 1967) est attribué au fait que le comportement normal de l'animal réapparaît lorsque une faible quantité d'amine peut de nouveau s'accumuler au niveau des terminaisons. L'accumulation des amines physiologiquement actives est associée à la présence de nouvelles vésicules au niveau des terminaisons (Dahlström et coll., 1967 ; Dahlström et Haggendal, 1970 ; Haggendal et Dahlström, 1971). Nos propres expériences ont permis de préciser ces phénomènes au niveau des terminaisons dopaminergiques striatales. En effet, l'état cataleptique intense induit par la réserpine 2 heures après son administration correspond aux effets biochimiques suivants.

a) Une inhibition très marquée de la synthèse de la ^{3}H-DA.

b) Une diminution très importante de la libération de la ^{3}H-DA.

Inversement, 48 heures après l'administration de la drogue, au moment où l'animal a pratiquement récupéré un comportement normal, nous constatons que :

a) les capacités d'incorporation de la DA réapparaissent puisque les taux de DA endogène augmentent ainsi que l'accumulation de la ^{3}H-DA ;

b) parallèlement à la récupération des capacités de stockage de la DA, l'inhibition de synthèse de la ^{3}H-DA est moins importante ;

c) les quantités de ^{3}H-DA libérées augmentent légèrement.

En conclusion, les effets biochimiques provoqués par la TZ et la réserpine au niveau des terminaisons dopaminergiques du striatum sont totalement opposées. Cependant ces drogues induisent chez le rat un effet comportemental identique : une réduction de l'activité locomotrice et un état cataleptique très caractéristique. Or, il a été démontré que la déficience des neurones dopaminergiques nigro-striataux s'accompagne d'un syndrome d'akinésie et de rigidité (Poirier et coll., 1972).

Les effets pharmacologiques observés après traitement des animaux avec de la TZ ou de la réserpine peuvent correspondre à une diminution du nombre des sites récepteurs normalement contrôlés par la DA. En effet, la réserpine provoque une réduction importante des quantités de DA libérée. La TZ, au contraire, augmente la libération de la DA, mais bloque les récepteurs dopaminergiques.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE "IN VIVO" DE LA LIBERATION DE LA ^{3}H-DA

INTRODUCTION

Les études faites "in vitro" nous ont permis de déterminer progressivement les conditions d'analyse de la libération de la ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine, et de les adapter à un modèle "in vivo". Le chat a été choisi comme animal d'expérimentation parce que le noyau caudé est assez important et relativement facile à atteindre.

Plusieurs techniques de superfusion avaient déjà été utilisées pour étudier la libération de la DA au niveau du noyau caudé chez le chat :

- la "push-pull" canule (Mac Lennan, 1964) ;
- la perfusion ventriculaire (Portig et Vogt, 1966, 1968).

Ces différentes techniques présentent cependant des inconvénients.

- La "push-pull" canule ne permet pas de superfuser une surface importante et peut provoquer une lésion au point de superfusion, ce qui risque d'entraîner des artéfacts. Par exemple, Chase et Kopin (1968) ont observé que des substances inertes telles que l'inuline ou l'urée peuvent être libérées dans l'effluent d'une push-pull canule implantée dans le lobe olfactif, lorsque l'animal est soumis à une stimulation olfactive intense. Ces effets ont été attribués à des modifications du débit sanguin ou de la perméabilité cellulaire plutôt qu'à une activation de la libération du transmetteur.

- La perfusion ventriculaire évite ces artéfacts, mais dans ce cas, il est difficile d'étudier la libération d'un transmetteur au niveau d'une région bien définie. En effet, les substances collectées peuvent provenir des différentes structures bordant le ventricule.

Nous avons tenté de développer une méthode palliant ces inconvénients. La technique de la cupule initialement utilisée au niveau du cortex cérébral pour mesurer la libération de l'Ach (Mitchell, 1963) a été adaptée au noyau caudé du chat. Une partie de la surface ventriculaire du noyau caudé, exposée après une décortication partielle, est délimitée par une cupule. Ce procédé permet :

1) de collecter la ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine ;

2) d'étudier la libération de ^{3}H-DA sur un grand nombre de terminaisons dopaminergiques uniquement localisées dans le noyau caudé.

Les deux méthodes de marquage utilisées in vitro sont examinées in vivo.

1) Le "marquage aigu" qui consiste à introduire une forte quantité de ^{3}H-tyrosine dans la cupule pendant un certain temps, puis à superfuser la surface du noyau caudé avec un liquide physiologique non radioactif.

2) Le "marquage continu" dans lequel la ^{3}H-tyrosine est ajoutée au liquide de superfusion, ce qui permet une synthèse continuelle de la ^{3}H-DA. Cette méthode, en raison de ces nombreux avantages, a été la plus utilisée.

Dans la suite de ce chapitre, nous présentons :

I - La technique de préparation de l'animal.

II - La validité de l'utilisation de la cupule pour mesurer la libération de la DA.

III - La libération de la ^{3}H-DA mesurée en utilisant les deux modes de marquage.

IV - L'étude des caractéristiques de la libération de la ^{3}H-DA.

V - L'influence de l'activité nerveuse sur la libération de la ^{3}H-DA.

VI - L'étude simultanée de la synthèse et de la libération de la ^{3}H-DA.

I - TECHNIQUES UTILISEES DANS L'ETUDE DE LA LIBERATION DE LA DA "IN VIVO".

Nous avons utilisé au cours de cette étude des chats en préparation aigue immobilisés avec du Flaxedil (R).

1 - Préparation des animaux.

L'anesthésie des animaux est induite en effectuant une injection intraveineuse lente de Penthotal (solution à 0,25 % ; 15 à 20mg/kg), ou dans la majorité des cas une injection intramusculaire de Kétamine (solution à 5 % ; 15 mg/kg). Cette anesthésie de courte durée permet d'effectuer une trachéotomie, de fixer l'animal dans l'appareil stéréotaxique (type Horsley - Clarke) et de placer une canule dans la veine saphène et l'artère fémorale. L'animal est ensuite immobilisé après une injection intraveineuse de Flaxedil(R) et ventilé artificiellement à l'aide d'une pompe Palmer. L'anesthésie est prolongée en introduisant dans le circuit de ventilation un mélange de fluothane (2 à 1 %),de protoxyde d'azote et d'oxygène (2-1 v/v) et est maintenue jusqu'à la mise en place de la cupule. Au cours de la superfusion du noyau caudé, l'animal anesthésié localement avec de la Xylocaïne reste immobilisé (injections répétées de Flaxedil20mg/hr) et ventilé artificiellement avec de l'air.

2 - Surveillance de l'animal.

Il nous a paru indispensable de contrôler certains paramètres tout au long de l'expérience, étant donné que l'état physiologique de l'animal peut varier et entraïner des modifications de libération de la ^{3}H-DA.

La température rectale est maintenue entre 37 et 38°C grâce à une couverture chauffante thermorégulée.

Nous suivons le rythme cardiaque qui est lent au cours de l'anesthésie (120 battements/minute) et qui devient plus rapide (240 battements/minute) lorsque l'animal est éveillé.

Un cathétère placé dans l'artère fémorale est relié à une sonde Statham et permet de suivre en permanence la pression artérielle de l'animal. Lorsque l'animal est correctement anesthésié avec du fluothane, la pression est de l'ordre de 80 mm de Hg, alors qu'elle est voisi-

ne de 150 mm de Hg chez l'animal éveillé. La pression artérielle se stabilise entre 130 et 150 mm de Hg lorsque la préparation éveillée est en bon état physiologique.

D'autre part, le pourcentage de CO_2 contenu dans l'air expiré est connu à chaque instant. Pour cela une fraction de l'air expiré est expulsé dans un fin cathéter introduit dans la trachée et relié à un analyseur de CO_2 à infra-rouge.

Le volume d'air inspiré est ajusté en fonction du taux de CO_2 contenu dans l'air expiré (le % de CO_2 est maintenu entre 3,5 et 4).

3 - Mise en place de la cupule (fig. 19).

Une trépanation assez importante est réalisée, et l'hémisphère gauche est dégagé de A = 23 à A = 3. La dure mère est incisée en étoile, puis réclinée sur l'os. Les vaisseaux sanguins, localisés à la surface du cortex sont coagulés en faisant passer un courant de haute fréquence. La zone corticale ainsi détruite est enlevée par aspiration. L'application de Spongel(R) et une légère compression permettent d'arrêter les hémorragies qui surviennent pendant cette intervention.

Lorsque le ventricule latéral est ouvert, la surface du noyau caudé est découverte en écartant avec soin les tissus avoisinants. Ensuite, la cupule en plastique dont la base est adaptée à la surface superfusée, est descendue délicatement sur le noyau caudé jusqu'à ce qu'il y ait une étanchéité entre la cupule et les tissus. La surface délimitée par la cupule est immédiatement superfusée pour éviter la formation d'un caillot ou la dessication des tissus.

4 - Description de la cupule (fig. 20).

Trois tubes métalliques sont solidaires de la cupule (leurs extrémités sont situées à 1 mm au dessus de la surface du noyau caudé). Ils permettent : 1°) d'amener le liquide physiologique au contact du noyau caudé 2°) de faire barboter un mélange d'O_2-CO_2(95-5v/v) dans le liquide physiologique afin de maintenir le pH constant et d'assurer un mélange continuel de la solution.

Le liquide superfusé est collecté en continu par l'intermédiaire d'un 3ème tube métallique relié à une pompe à vide et dont l'extrémité est située environ 7 mm au dessus de la surface du noyau caudé. Grâce à ce dispositif le liquide de superfusion est continuel-

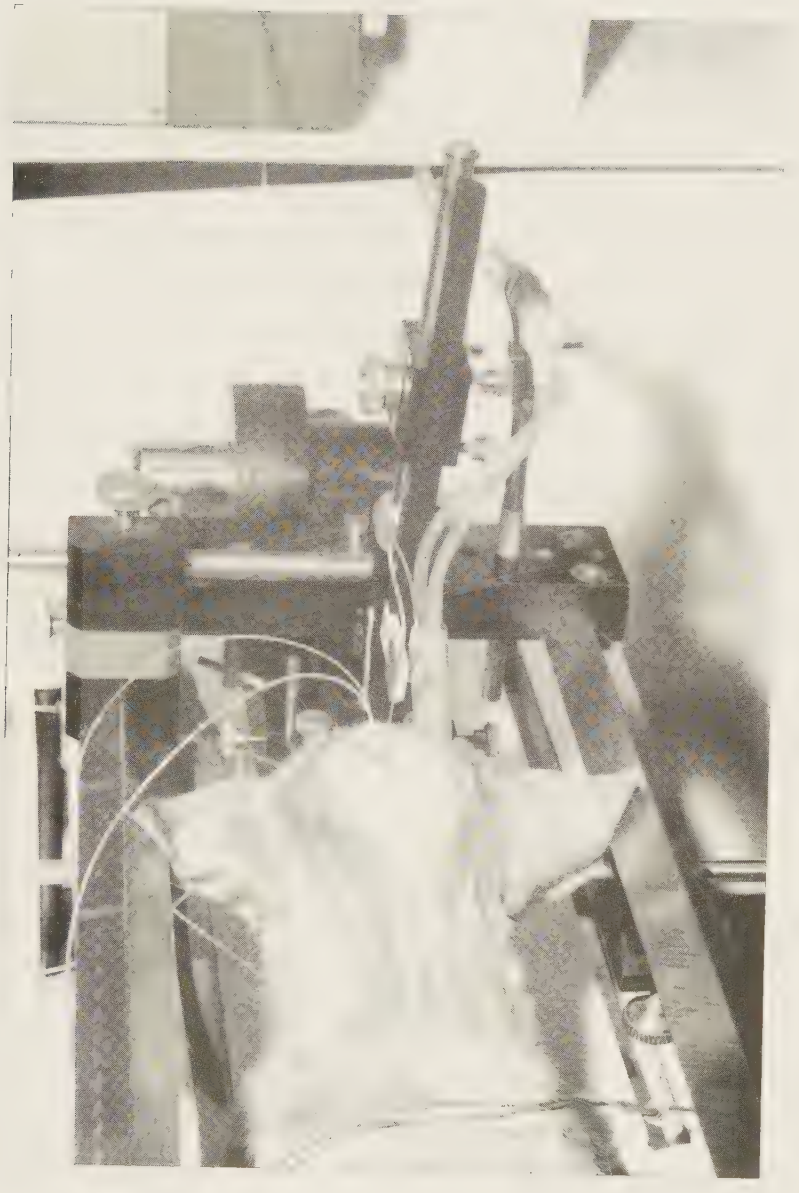


Fig.19 : Fixation de l'animal, et mise en place de la cupule.

lement capté, et le volume de liquide contenu dans la cupule reste constant (environ 200 µl).

5 - Marquage des terminaisons dopaminergiques du noyau caudé et mesure de la libération de la ^{3}H-DA.

Deux protocoles sont utilisés pour marquer les terminaisons dopaminergiques du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine.

a) "marquage aigu". 200 µl de liquide physiologique contenant de 100 à 250 µCi de ^{3}H-tyrosine sont introduits dans la cupule pendant 20 à 30 minutes. Puis la solution radioactive est enlevée et la surface du noyau caudé est superfusée en continu avec le liquide physiologique oxygéné et maintenu à 37°C. La surface du noyau caudé est lavée pendant 2 minutes afin d'éliminer la ^{3}H-tyrosine non captée spécifiquement ; puis les superfusats sont collectés et analysés par fraction de 15 minutes.

b) "marquage continu". Le liquide physiologique contenant la ^{3}H-tyrosine (30 à 50 µCi/ml) est introduit dans la cupule à vitesse constante (6ml/heure) et collecté continuellement pendant des fractions successives de 10 ou 5 minutes.

Les superfusats sont recueillis à 0°C en présence de 0,2 ml de la solution stabilisatrice et de 3 ml d'alcool absolu. A la fin de chaque expérience, le noyau caudé est rapidement prélevé et homogénéisé dans un mélange d'éthanol-eau (3 = 1 v/v).

Les échantillons sont conservés à -17°C et sont ensuite analysés pour la détermination de leur contenu en ^{3}H-DA. (Voir chapitre des techniques)

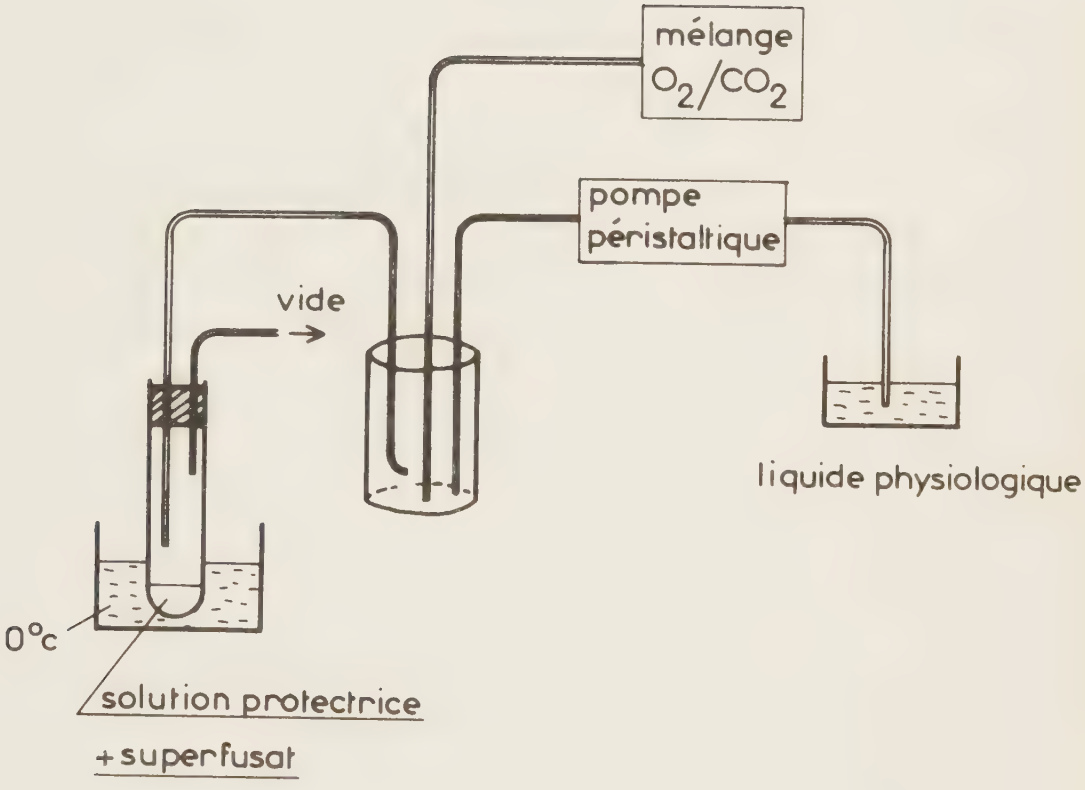


Fig.20 : Description schématique de la cupule utilisée pour superfuser la surface du noyau caudé chez le chat.

II - VALIDITE DE LA TECHNIQUE DE LA CUPULE POUR L'ETUDE "IN VIVO" DE LA LIBERATION DE LA DA.

Des contrôles électrophysiologiques réalisés en collaboration avec P. Feltz et des contrôles histologiques effectués en collaboration avec A. Calas révèlent que le tissu nerveux localisé sous la cupule conserve son intégrité pendant plusieurs heures après le début de la superfusion.

1 - Contrôles électrophysiologiques.

Les caractéristiques électrophysiologiques des cellules striatales localisées 1 mm environ en dessous de la surface superfusée ont été testées au cours de certaines expériences biochimiques. Une électrode bipolaire en acier est introduite dans la substance noire (A=4 ; L = 4 ; H = -4 ou -5). Nous avons admis généralement que l'électrode se trouvait placée dans la substance noire lorsque la réponse somatosensorielle enregistrée dans le lemnisque médian disparaissait complètement. Une seconde électrode bipolaire implantée dans le noyau caudé permet d'enregistrer l'activité des groupes cellulaires au cours de la stimulation de la substance noire (choc rectangulaire = durée de 0,2 à 0,5 msec ; voltage 5 à 10V ; fréquence 1/sec.).L'activité évoquée par la stimulation de la substance noire comporte plusieurs composantes et la latence de la réponse est située entre 15 et 20 msec. (fig. 21-partie I).

P. Feltz par ailleurs utilisant une préparation identique a analysé les caractéristiques des réponses unitaires au niveau du noyau caudé, après stimulation de la substance noire (fig. 21- partie II) (Feltz et Mc Kenzie, 1969) ou après application iontophorétique de diverses drogues (Feltz et de Champlain, 1972).

Ces résultats nous indiquent que la technique de superfusion utilisée permet de conserver les cellules du noyau caudé en bon état physiologique.

2 - Contrôles histologiques.

Des études autoradiographiques effectuées au niveau des tissus superfusés pendant plusieurs heures avec de la ^{3}H-tyrosine permettent de visualiser la localisation de la tyrosine radioactive (fig. 22).

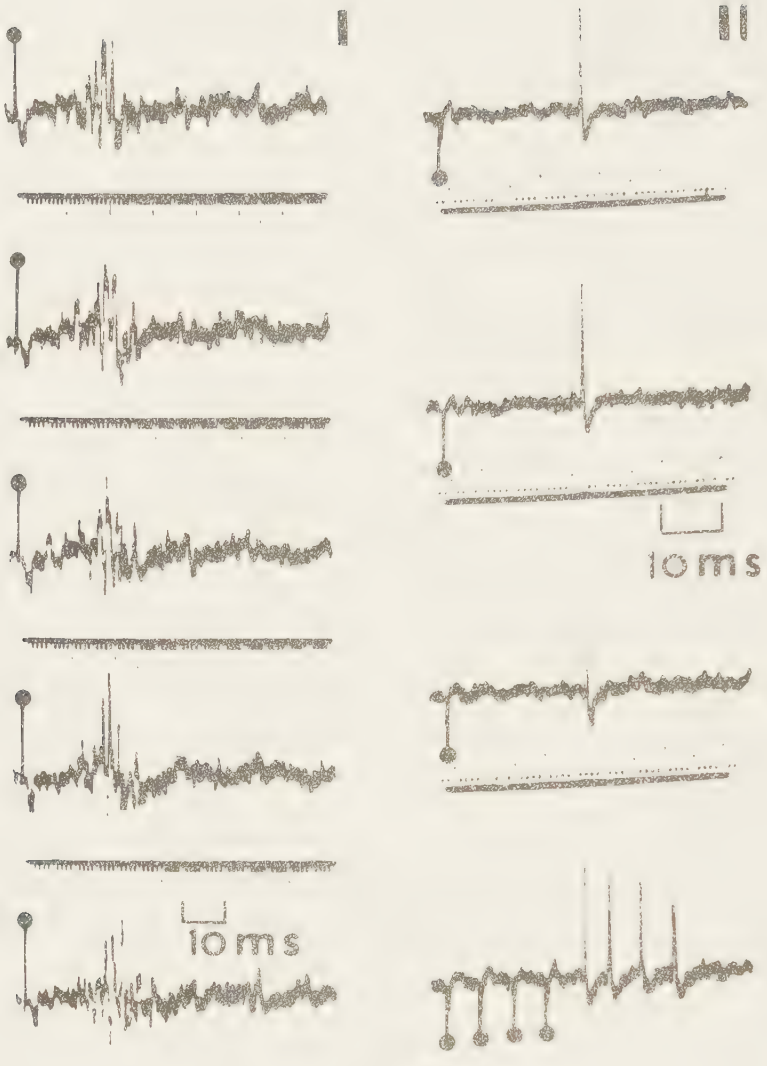


Fig.21 : Effet de la stimulation de la substance noire sur l'activité des cellules localisées en dessous de la surface superfusée du noyau caudé.

I - Les enregistrements sont effectués avec une macroélectrode bipolaire placée dans le noyau caudé, 1 mm en dessous de la cupule, pendant une expérience d'étude le la libération de la ^{3}H-DA. Un potentiel évoqué complexe est observé 15 à 20 msec après un seul choc de stimulation de la substance noire.

II - Réponse unitaire enregistrée avec une microélectrode de verre introduite à 800 µm de la surface superfusée du noyau caudé. Trois images sont prises à 1 seconde d'intervalle correspondant à 3 chocs uniques et successifs de stimulation de la substance noire. La latence de la réponse à la stimulation nigrale est constante. La réponse à un train de 4 chocs est représentée en bas de la figure.

La ^{3}H-tyrosine est distribuée dans le tissu selon un gradient de concentration allant de la surface du noyau caudé jusqu'aux couches les plus profondes. Il est aussi intéressant de noter que la ^{3}H-tyrosine est captée par certains corps cellulaires et participe à ce niveau à la synthèse protéique comme l'indique le transport de matériel radioactif le long de certains axones (fig. 22).

Des études en microscopie électronique révèlent également que les terminaisons sont bien préservées. Il nous a été possible d'idenfier des terminaisons sérotoninergiques en superfusant le noyau caudé avec de faibles concentrations de ^{3}H-5HT (10^{-7}M) (Calas et coll., en préparation).

Ces différentes approches démontrent que les tissus localisés sous la cupule conservent leurs caractéristiques électrophysiologiques et biochimiques, ce qui valide l'utilisation de la cupule pour l'étude "in vivo" de la libération de la ^{3}H-DA.

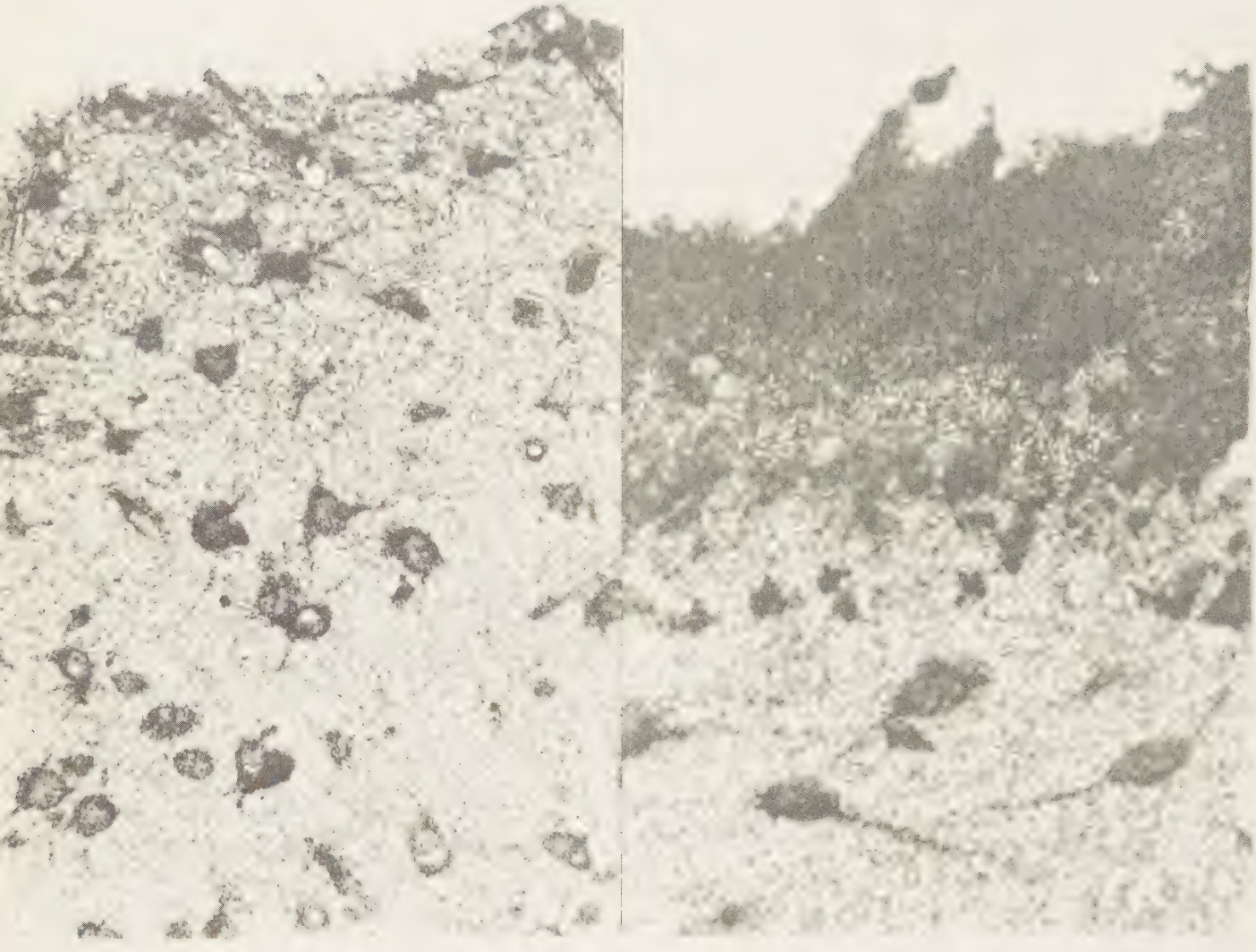


Fig.22 : Histoautoradiographie d'une coupe sagittale du noyau caudé, réalisée après 3 heures de superfusion avec de la ^{3}H-tyrosine (40 µCi/ml - vitesse 6 ml/heure). La ^{3}H-tyrosine est distribuée dans le tissu selon un gradient de concentration. Certains corps cellulaires sont marqués ainsi que quelques prolongements axomiques (fig. de droite réalisée à un plus fort grossissement).

III - LIBERATION DE LA ^{3}H-DA AU NIVEAU DES TERMINAISONS DOPAMINERGIQUES DU NOYAU CAUDE, MARQUEES PREALABLEMENT AVEC DE LA ^{3}H-TYROSINE.

1 - Identification par cochromatographie de la ^{3}H-DA libérée et accumulée dans les tissus.

a) Protocole opératoire.

Une solution physiologique (200 µl) contenant 100 µCi de ^{3}H-tyrosine purifiée est introduite pendant 30 minutes dans la cupule placée à la surface du noyau caudé du chat éveillé. La ^{3}H-tyrosine, non captée spécifiquement, est ensuite éliminée. La surface du noyau caudé est superfusée pendant 2 heures avec un liquide physiologique ne contenant pas de ^{3}H-tyrosine. Celui-ci est introduit dans la cupule à la vitesse de 6 ml/h. Les superfusats sont collectés par fraction de 15 minutes, et le noyau caudé est prélevé à la fin de chaque expérience. Les échantillons sont ensuite analysés et les ^{3}H-CA présentes sont identifiées. La radioactivité détectée dans les éluats de l'alumine révèle la présence de CA radioactives. L'identification de ces ^{3}H-CA est obtenue après acétylation et cochromatographie.

b) Résultats.

Un seul pic radioactif est détecté au niveau de la tâche d'acétyl DA, après cochromatographie des dérivés acétylés des ^{3}H-CA provenant des liquides de superfusion ou du noyau caudé (fig. 23). La ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine est donc libérée spontanément et peut être détectée dans le liquide de superfusion.

2 - Analyse de la libération spontanée de la ^{3}H-DA : effet de l'anesthésie.

a) Protocole expérimental.

La libération de la ^{3}H-DA est étudiée d'une part sur des préparations éveillées, immobilisées avec du Flaxedil$^{(R)}$ et d'autre part sur des préparations immobilisées avec du Flaxedil et anesthésiées avec un mélange de protoxyde d'azote et d'oxygène (2 : 1 v/v) contenant 1,5 % de penthrane.

Les terminaisons dopaminergiques du noyau caudé sont marquées de façon "aigue" avec de la ^{3}H-tyrosine (250 µCi dans 200 µl de liquide physiologique) pendant 20 minutes. La ^{3}H-tyrosine est ensuite retirée, lavée, puis les superfusats sont collectés pendant 2 heures

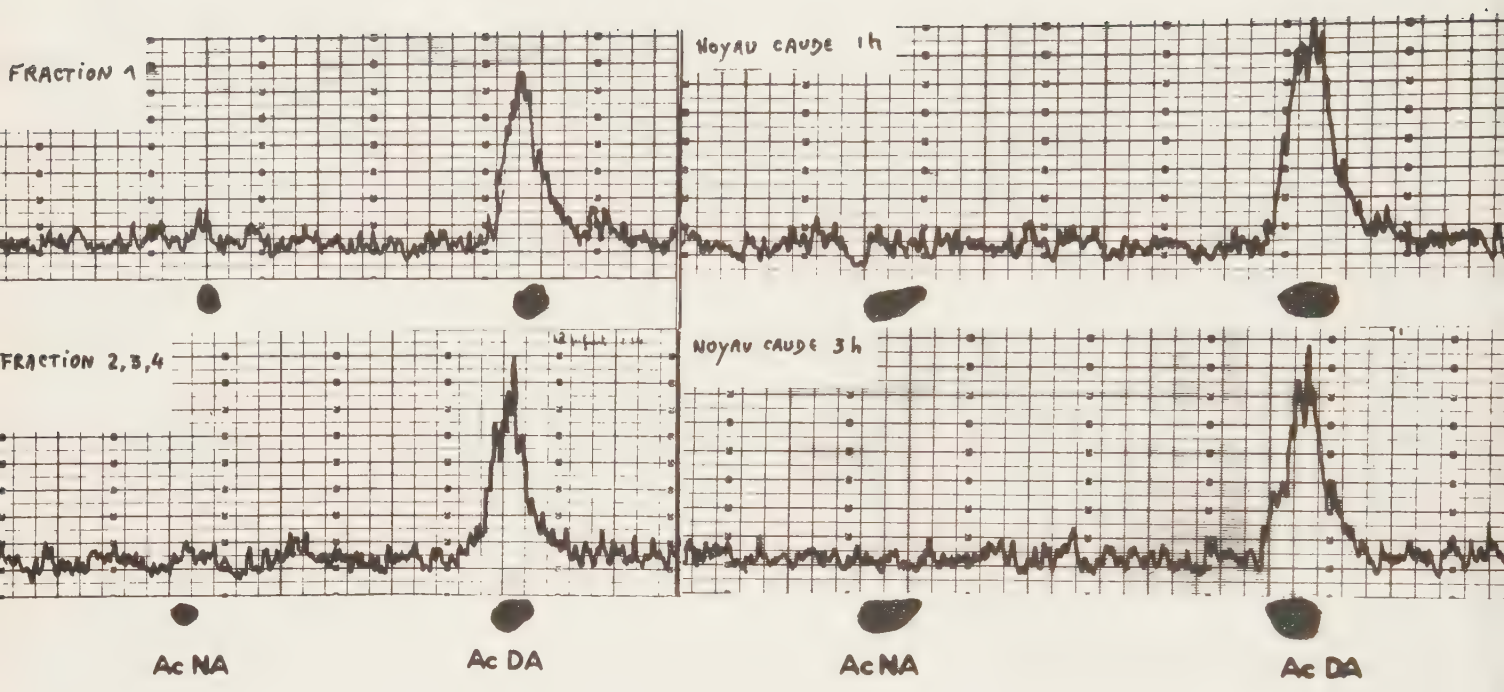


Fig.23 : Identification de la ^{3}H-DA dans le superfusats et le noyau caudé, après un marquage "aigu" des terminaisons dopaminergiques avec de la ^{3}H-tyrosine.

La surface du noyau caudé est marquée avec de la ^{3}H-tyrosine puis superfusée avec un liquide physiologique pendant 1 heure ou 3 heures. Les fractions successives de superfusats collectées pendant 15 min. sont analysées. Les ^{3}H-CA sont identifiées dans la 1ère fraction de superfusion d'une part, et dans les fractions suivantes (2,3,4) rassemblées. A la fin de la superfusion (1h ou 3h) les noyaux caudés sont prélevés et les ^{3}H-CA accumulées dans les tissus sont analysées. Tous les radiochromatogrammes de ^{3}H-CA provenant des superfusats ou des tissus présentent un seul pic radioactif correspondant à l'^{3}H-acétyl DA.

par fractions successives de 15 minutes, puis analysés.

Dans quelques cas seulement, le marquage des terminaisons dopaminergiques et la superfusion ont été répétées plusieurs fois (2 à 5) au cours d'une même expérience.

b) Résultat et discussion.

Les quantités de ^{3}H-DA libérées dans les fractions successives du superfusat sont représentées dans la figure 24. Le diagramme correspond aux valeurs moyennes de ^{3}H-DA libérées au cours de 12 expériences de superfusion.

Chez l'animal éveillé, l'histogramme des quantités de ^{3}H-DA libérées pendant les 4 premières fractions se décompose en deux parties. La libération de la ^{3}H-DA diminue de 43 % entre la 17ème et la 32ème minute de superfusion. Dans les fractions suivantes la diminution de libération de la ^{3}H-DA est beaucoup moins importante (9 et 2 %) et n'est plus significativement différente d'une fraction à l'autre.

Les quantités de ^{3}H-DA libérées, exprimées en valeurs logarithmiques, décroissent avec une demi-vie de 18 minutes pendant la première phase de la superfusion. Par contre entre la 17ème et la 62ème minute, la diminution de la libération de la ^{3}H-DA a une demi-vie de 60 minutes.

Ces résultats indiquent qu'au moment où la ^{3}H-DA est nouvellement synthétisée, l'amine est libérée en quantité importante et rapidement utilisée.

Chez l'animal anesthésié, l'histogramme des quantités de ^{3}H-DA libérées n'est plus biphasique. Pendant la seconde fraction de 15 minutes de superfusion, les quantités de ^{3}H-DA libérées sont légèrement (15 %) mais non significativement diminuées par rapport à celles libérées pendant la 1ère fraction de la superfusion (fig. 24). Par ailleurs, la décroissance des quantités de ^{3}H-DA libérées pendant les fractions 2, 3 et 4 est relativement plus lente (demi-vie 90 minutes) que chez l'animal éveillé.

L'anesthésie semble ralentir la vitesse d'utilisation de la ^{3}H-DA. Certains résultats obtenus au cours d'expériences où le noyau caudé est marqué répétitivement avec de la ^{3}H-tyrosine sont en faveur de cette hypothèse. Après un seul marquage avec de la ^{3}H-tyrosine, les quantités de ^{3}H-DA libérée sont sensiblement équivalentes chez l'animal éveillé (1,15 $\pm$ 0,09 nCi) et chez l'animal anesthésié (1,17 $\pm$ 0,13nCi).

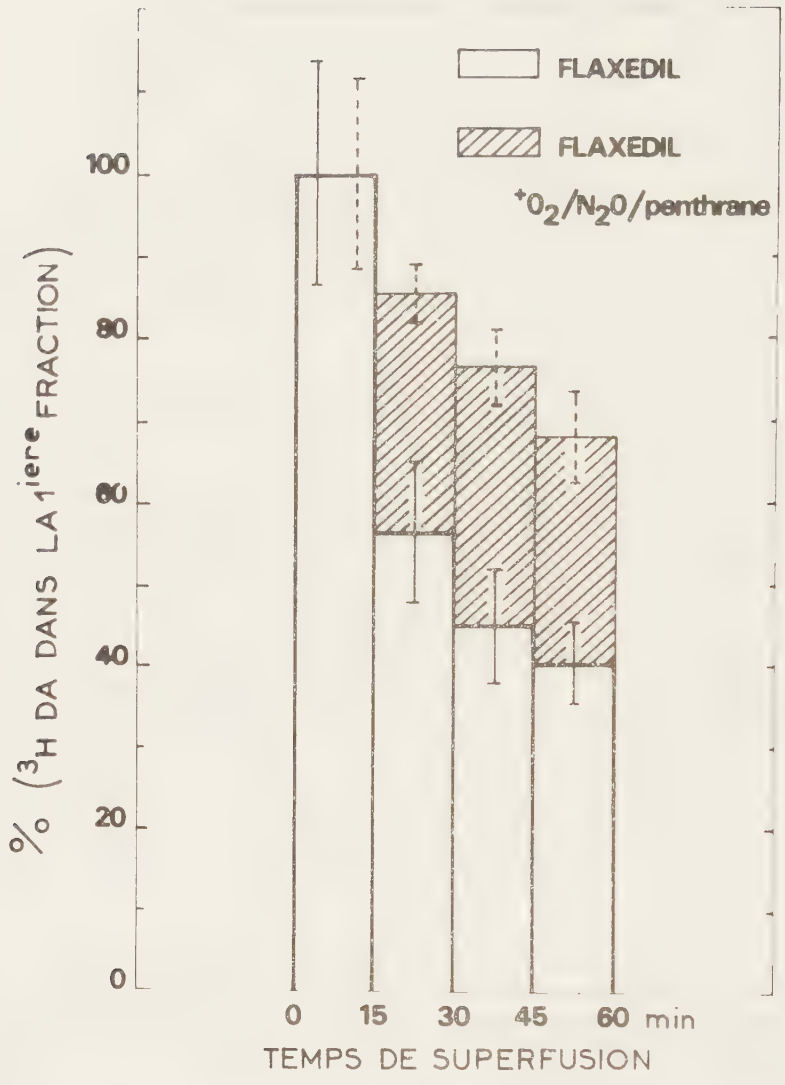


Fig.24 : Effet de l'anesthésie sur la libération spontanée de la ^{3}H-DA préalablement synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine.

Les chats sont immobilisés avec du Flaxedil, localement anesthésiés ou continuellement anesthésiés avec un mélange d'O_2-N_2O (1 : 3 v/v) - penthrane (1 %). Dans tous les cas, la surface du noyau caudé délimitée par la cupule est marquée avec de la ^{3}H-tyrosine (250 µCi) introduite pendant 20 min. dans la cupule, puis superfusée avec un liquide physiologique non radioactif. La ^{3}H-DA libérée est mesurée dans les fractions successives de 15 min. Les valeurs pour chaque groupe correspondent à la moyenne de 10 supeufusions, et sont exprimées en pourcentage de quantités de ^{3}H-DA trouvées dans la 1ère fraction de chaque expérience de superfusion.

TABLE 21

Effet du marquage répété avec de la ^{3}H-tyrosine sur la libération de la ^{3}H-DA du noyau caudé de chats anesthésiés et non anesthésiés.

Période de marquage	1		^{3}H-DA libérée (% de la 1ère fraction)			
	%	nCi	2	3	4	5
Flaxedil + O_2 - N_2O - penthrane						
1	100	(0.82)	128	-	-	-
2	100	(0.64)	144	218	-	-
3	100	(1.19)	115	135	-	-
4	100	(1.16)	122			
Flaxedil						
5	100	(1.60)	56	53	-	-
6	100	(1.34)	118	69	112	102

La surface du noyau caudé est marquée répétitivement avec de la ^{3}H-tyrosine (250 µCi). L'acide aminé tritié est introduit dans la cupule pendant 20 minutes, et ceci est répété 2 à 5 fois au cours d'une même expérience. Entre chaque période de "marquage" (90 minutes), la surface du noyau caudé est superfusée avec un liquide physiologique non radioactif. Les quantités de ^{3}H-DA libérées dans la 1ère fraction de superfusion sont mesurées après chaque période de marquage. Les résultats individuels obtenus avec 6 animaux sont exprimés en pourcentage par rapport aux quantités de ^{3}H-DA trouvées dans la 1ère fraction correspondant à la première période de marquage. (Les valeurs entre parenthèse correspondent aux quantités absolues de ^{3}H-DA retrouvée dans la 1ère fraction).

Lorsque le marquage est répété, les quantités de ^{3}H-DA libérées pendant la 1ère fraction de chaque période de superfusion augmentent progressivement après chaque marquage chez l'animal anesthésié. Par contre ceci n'est pas observé chez l'animal éveillé (table 21).

3 - Vitesse d'utilisation de la ^{3}H-DA accumulée dans le noyau caudé.

Dans certaines expériences, après avoir marqué et superfusé le noyau caudé gauche, le noyau contralatéral est lui-même marqué avec de la ^{3}H-tyrosine et superfusé pendant un temps variable. A la fin de la superfusion les noyaux caudés sont prélevés, disséqués et analysés. De cette façon, l'accumulation de la ^{3}H-DA dans les tissus peut être déterminée après différents temps de superfusion. Ceci a permis de calculer une courbe de régression sur la base de chaque résultat expérimental. Afin de simplifier les calculs, nous avons admis que la ^{3}H-DA se trouvait localisée dans un seul compartiment. La demi-vie d'utilisation de la ^{3}H-DA, calculée à partir de la courbe, est de l'ordre de 3h. (fig. 25)

4 - Conclusion.

Ces premières expériences réalisées "in vivo" chez le chat montrent que la ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine est libérée spontanément. Il est d'autre part possible de distinguer plusieurs formes de stockage de la ^{3}H-DA en analysant les caractéristiques de sa libération. La diminution biphasique des quantités de ^{3}H-DA libérées, reflète vraisemblablement l'utilisation de la ^{3}H-DA au niveau de deux compartiments présentant des caractéristiques métaboliques différentes. De même chez le rat, deux vitesses d'utilisation de la DA striatale ont été calculées après inhibition de la synthèse de l'amine par l'α-méthyl-para-tyrosine (Javoy et Glowinski, 1971).

La diminution très marquée de la libération de la ^{3}H-DA (43 %) observée pendant la seconde fraction de la superfusion est un index de l'utilisation très rapide de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée au niveau des tissus. La demi-vie d'utilisation très rapide de la ^{3}H-DA, calculée à partir des quantités de ^{3}H-DA libérées en fonction du temps de superfusion, est de l'ordre de 18 minutes. Cette valeur est assez voisine de la demi-vie de disparition de la DA striatale (9 minutes)

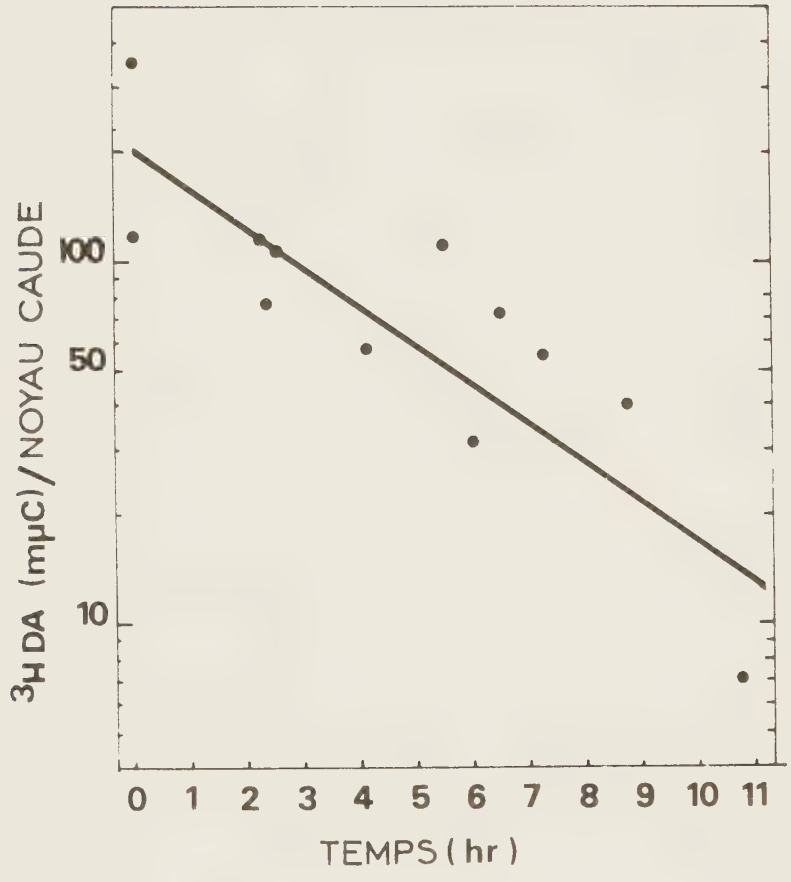


Fig.25 : Utilisation de la ^{3}H-DA dans les terminaisons dopaminergiques du noyau caudé chez le chat.

La surface du noyau caudé délimitée par la cupule est marquée avec de la ^{3}H-tyrosine (50 μCi) introduit dans la cupule pendant 20 min. Les animaux sont sacrifiés à des temps variables après le début de la superfusion, et la ^{3}H-DA accumulée dans le noyau caudé est déterminée. La courbe de régression établie sur 12 résultats individuels est calculée en estimant par simplification que la ^{3}H-DA est localisée dans un seul compartiment.

se trouvant dans un compartiment d'utilisation rapide (Javoy et Glowinski, 1971).

Une vitesse d'utilisation plus lente est également décrite au niveau de striatum du lapin (Costa et Neff, 1966) ou du rat (Javoy et Glowinski, 1971). Les valeurs trouvées sont sensiblement équivalentes à la vitesse d'utilisation que nous avons calculée à partir de la courbe de disparition de la ^{3}H-DA tissulaire, deux heures après sa synthèse. Cette vitesse d'utilisation est cependant beaucoup plus lente que celle calculée à partir de la diminution de la libération au cours des fractions 2,3 et 4.

Les effets induits par l'anesthésie sont en accord avec d'autres résultats qui montrent que les anesthésiques diminuent la vitesse de renouvellement des CA (Schandberg et coll. 1967). Portig et Vogt (1969) observent également une diminution du métabolisme de la DA sous l'effet d'une injection de chloralose. En effet, la concentration de HVA recueilli dans le liquide de perfusion du ventricule diminue après chaque administration d'anesthésique.

Dans notre étude nous observons que les quantités de ^{3}H-DA libérées pendant chaque fraction de superfusion diminuent beaucoup plus lentement chez l'animal anesthésié avec du penthrane que chez l'animal éveillé. Parallèlement, les quantités de ^{3}H-DA accumulées dans les tissus sont plus importantes chez l'animal anesthésié que chez l'animal éveillé (760 et 1650 mμCi respectivement après 6 périodes consécutives de marquage).

Ces différents résultats montrent que l'anesthésie ralentit principalement l'utilisation de la ^{3}H-DA dans le compartiment où la vitesse de renouvellement de l'amine est très rapide.

IV - LIBERATION DE LA ^{3}H-DA AU NIVEAU DE TERMINAISONS DOPAMINERGIQUES MARQUEES "EN CONTINU" AVEC DE LA ^{3}H-TYROSINE.

Les résultats obtenus précédemment suggèrent que la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée est localisée dans un compartiment où l'amine a une vitesse de renouvellement très grande et est facilement disponible pour la libération. Nous avons cherché à améliorer la technique de marquage en introduisant continuellement de la ^{3}H-tyrosine, afin de suivre la libération de l'amine tritiée nouvellement synthétisée.

Cette technique qui a nécessité la mise au point d'une très bonne méthode de purification de la ^{3}H-tyrosine afin de réduire la contamination due aux produits de dégradation de l'acide aminé tritié, a l'avantage de pouvoir être utilisée pour étudier la libération de la ^{3}H-DA pendant plusieurs heures.

1 - Identification par cochromatographie des ^{3}H-CA libérées dans les superfusats et accumulées dans les tissus.

a) Protocole opératoire.

Lorsque la cupule est placée sur la surface ventriculaire du noyau caudé, l'anesthésie est arrêtée. L'animal est maintenu immobilisé par administration de Flaxedil$^{(R)}$ (20 mg/heure) et insensibilisé localement par des injections de xylocaïne.

Lorsque l'animal est éveillé, la surface du noyau caudé délimitée par la cupule est superfusée continuellement avec le liquide physiologique contenant 40 µCi/ml de ^{3}H-tyrosine, introduit à la vitesse de 6 ml/h. L'identification des ^{3}H-CA libérées a été réalisée sur des superfusats collectés pendant les 3 premières heures de superfusion et entre la 5ème et la 7ème heure de superfusion (fractions successives de 10 minutes). A la fin de l'expérience (3^h ou 7^h), le noyau caudé est prélevé, disséqué et homogénéisé (voir méthodes). Les ^{3}H-CA contenues dans les échantillons sont séparées de la ^{3}H-tyrosine et des ^{3}H-métabolites par passage sur une résine amberlite et sur une colonne d'alumine. Les ^{3}H-CA éluées de la colonne d'alumine sont acétylées et cochromatographiées (les éluats correspondants respectivement aux liquides collectés entre 0 et 3^h ou 5 et 7^h de superfusion sont groupés avant l'acétylation).

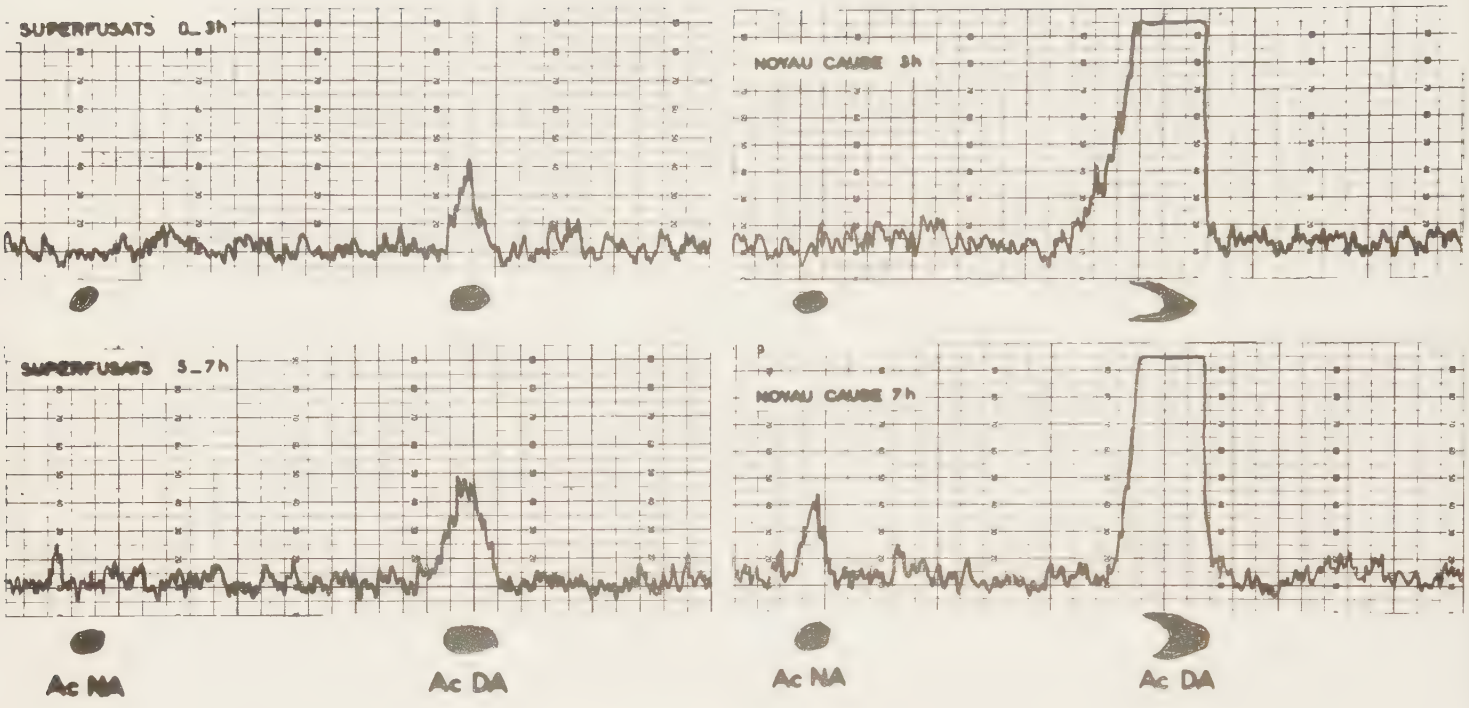


Fig.26 : Identification des ^{3}H-CA contenues dans les superfusats et le noyau caudé après un marquage "continu" des terminaisons dopaminergiques avec de la ^{3}H-tyrosine.

La surface du noyau caudé est superfusée continuellement avec un liquide physiologique contenant de la ^{3}H-tyrosine (40µCi/ml). Les superfusats sont collectés par fraction de 15 min., puis analysés. Les ^{3}H-CA sont identifiées dans les fractions collectées pendant les 3 premières heures de la superfusion, et entre la 5ème et la 7ème heure de superfusion. Les éluats de l'alumine des fractions correspondant à ces deux périodes de superfusion sont rassemblés, et les ^{3}H-CA sont acétylées et cochromatographiées. A la fin de la superfusion (3h ou 7h) les noyaux caudés sont prélevés et les ^{3}H-CA accumulées dans les tissus sont séparées, acétylées et cochromatographiées.

b) Résultats.

Les radiochromatogrammes des ^{3}H acétyl CA obtenus à partir des deux séries de superfusats présentent un seul pic radioactif localisé au niveau de la tâche d'acétyl DA (fig. 26). Par contre, deux pics radioactifs, correspondant l'un à l'acétyl NA, l'autre à l'acétyl DA, sont détectés sur les chromatogrammes des dérivés acétylés obtenus à partir des ^{3}H-CA contenues dans les tissus (fig.26). Cependant le pic d'^{3}H-acétyl DA est très important comparé au pic d'^{3}H-acétyl NA. Les rapports de ^{3}H-acétyl NA et de ^{3}H-acétyl DA sont 1/95 après 3 heures de superfusion et 1/60 après 7h de superfusion. Par conséquent, la ^{3}H-NA formée en très faible quantité au niveau du noyau caudé n'est pas détectée dans les liquides de superfusion. Nous avons donc considéré au cours de ces études que les quantités de ^{3}H-NA pouvant être présentes dans les superfusats, étaient négligeables.

2 - Analyse de la répartition de la ^{3}H-DA et de la ^{3}H-tyrosine au niveau du noyau caudé.

Des coupes sériées (200 µ) sont faites parallèlement à la surface du noyau caudé superfusé pendant 5 heures avec de la ^{3}H-tyrosine. Chaque coupe est homogénéisée et l'accumulation de ^{3}H-DA et de ^{3}H-tyrosine est mesurée (table 22). La couche superficielle des tissus est très marquée puisque 40 % de la radioactivité totale du noyau caudé se trouve dans la 1ère coupe de 200 µ. D'autre part, l'accumulation de la ^{3}H-DA suit exactement la répartition de la ^{3}H-tyrosine.

Les résultats concernant la répartition de la radioactivité au niveau des tissus superfusés, sont également retrouvés dans une étude histo-autoradiographique effectuée sur des coupes saggitales de noyau caudé (fig. 22).

3 - Libération spontanée de ^{3}H-DA et mesure de l'accumulation de la ^{3}H-DA dans les tissus en fonction du temps de superfusion.

a) Protocole opératoire.

La surface ventriculaire du noyau caudé est superfusée en continu avec de la ^{3}H-tyrosine (40 µCi/ml) pendant des temps variables. La ^{3}H-DA libérée dans le liquide de superfusion est mesurée dans les fractions successives de 10 minutes. A la fin de chaque expérience, le noyau caudé est prélevé, et les quantités de ^{3}H-DA accumulée dans les

TABLE 22

Répartition de la ^{3}H-DA et de la ^{3}H-tyrosine dans des coupes successives du noyau caudé.

numéro des coupes	^{3}H-DA mμCi	^{3}H-tyrosine mμCi
1	130	44
2	78	23
3	35	14
4	16	7
5	7	4
6	4	2
7	3	3
8	1	1.2
9	0.7	0.9

La surface du noyau caudé est superfusée en continu avec de la ^{3}H-tyrosine pendant 6 heures. Le noyau caudé est ensuite prélevé et refroidi. Des coupes (200μ) sont effectuées parallèlement à la surface superfusée, puis homogénéisées, et analysées afin de mesurer les quantités de ^{3}H-DA et de ^{3}H-tyrosine accumulées dans chacune des coupes.

tissus sont déterminées.

b) Résultats.

Les quantités de ^{3}H-DA libérées augmentent progressivement en fonction du temps de superfusion pendant les 90 premières minutes qui suivent l'introduction de la ^{3}H-tyrosine dans le liquide de superfusion (fig. 27). Ensuite, la libération de la ^{3}H-DA atteint un plateau qui reste presque constant pendant les heures suivantes de la superfusion (fig. 27). Par contre, les taux de ^{3}H-DA accumulée dans les tissus augmentent linéairement en fonction du temps de superfusion (fig. 27).

4 - Discussion.

Il est possible d'étudier la libération de la ^{3}H-DA synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine continuellement ajoutée au liquide de superfusion. Seule la ^{3}H-DA peut être détectée dans le liquide de superfusion, comme l'indique l'analyse chromatographique. D'après l'étude de la répartition de la ^{3}H-DA et de la ^{3}H-tyrosine dans les tissus, il apparaît que la ^{3}H-DA libérée provient principalement des terminaisons dopaminergiques localisées dans les couches superficielles du noyau caudé. D'autre part, les quantités de ^{3}H-DA libérées ne sont pas directement proportionnelles aux quantités de ^{3}H-DA accumulées dans les tissus. Ceci suggère que la ^{3}H-DA localisée dans différents compartiments au niveau des terminaisons ne participe pas en totalité aux mécanismes de libération.

La rupture de pente des quantités de ^{3}H-DA libérées, généralement observée après 90min de superfusion, peut correspondre au moment où l'activité spécifique de la DA devient constante dans le compartiment ayant une vitesse de renouvellement rapide et participant préférentiellement aux processus de libération.

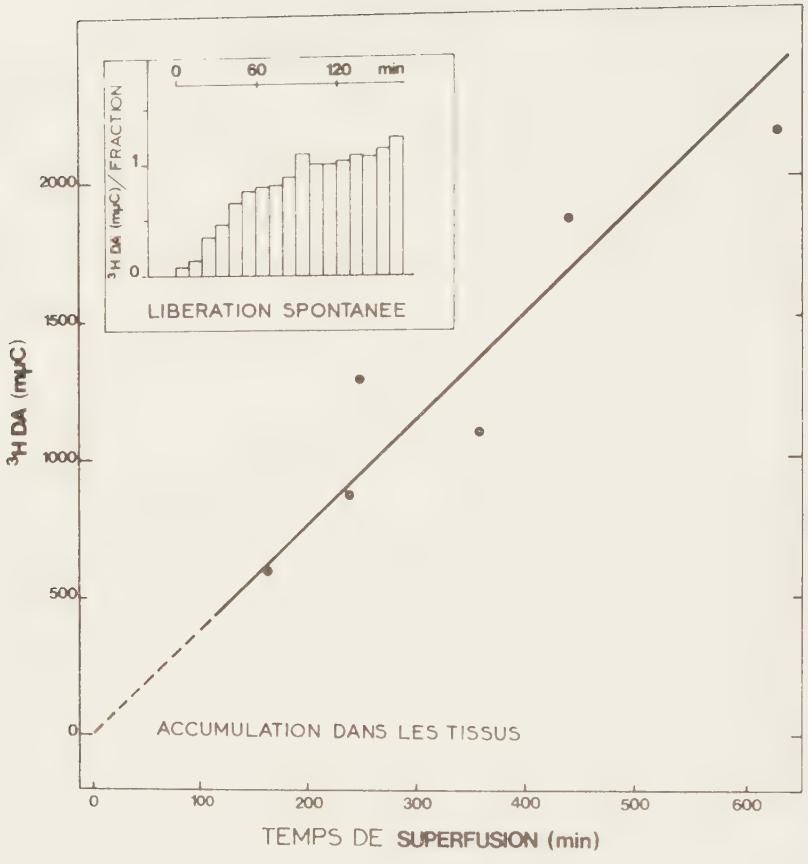


Fig.27 : Libération spontanée et accumulation de la ^{3}H-DA au niveau du noyau caudé continuellement superfusé avec de la ^{3}H-tyrosine.

Un histogramme des quantités de ^{3}H-DA libérées spontanément dans les fractions successives de superfusion est représenté en haut de la figure.

D'autre part, après différents temps de superfusion continue avec de la ^{3}H-tyrosine, les animaux sont sacrifiés. Le noyau caudé superfusé est prélevé et la ^{3}H-DA accumulée dans les tissus est mesurée.

V - COMPARTIMENTALISATION ET ANALYSE DU RÔLE FONCTIONNEL DES DIFFERENTES FORMES DE STOCKAGE DE LA DA.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la DA contenue dans les terminaisons dopaminergiques du striatum du rat est localisée au moins au niveau de deux formes de stockage ayant des caractéristiques d'utilition différentes(Javoy et Glowinski, 1971). D'autre part, certaines données obtenues au cours de cette étude (1ère partie - I, début de ce chapitre) indiquent que la DA nouvellement synthétisée joue un rôle prépondérant dans les processus de libération. C'est pourquoi, nous avons poursuivi l'analyse du rôle des diverses formes de stockage le la ^{3}H-DA dans les mécanismes de libération.

Pour cela nous avons examiné :

1) Les effets de Catron$^{(R)}$ sur la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée ou stockée depuis plus longtemps au niveau des terminaisons dopaminergiques en utilisant les deux méthodes de marquage décrites.

2) La libération spontanée de la ^{3}H-DA après inhibition de la synthèse par l'α-méthyl-para-tyrosine.

3) La libération induite par l'amphétamine ou un excés d'ions K^+, lorsque la synthèse de la DA est inhibée.

1 - Effet du Catron$^{(R)}$ sur la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée ou stockée depuis plus longtemps au niveau des terminaisons.

Le Catron$^{(R)}$ est un puissant inhibiteur de la MAO et favorise la libération de la ^{3}H-DA, comme nous l'avons démontré au cours des expériences de superfusion in vitro du striatum du rat.

a - Protocole opératoire.

Les effets du Catron$^{(R)}$ ajouté au liquide de superfusion (5×10^{-5} M) sont examinés d'une part au cours de la superfusion "en continu" du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine (30 µCi/ml) et d'autre part après un marquage préalable des terminaisons dopaminergiques avec de la ^{3}H-tyrosine (250 µCi contenus dans 200 µl de liquide physiologique).

b - Résultats.

Environ deux heures après avoir marqué les terminaisons dopa-

minergiques, l'addition de Catron$^{(R)}$ (5×10^{-5} M) au liquide de superfusion provoque une faible augmentation de la libération de la ^{3}H-DA (fig. 28). Les valeurs maximales de libération de la ^{3}H-DA obtenues dans la 2ème et 3ème fraction après le début de l'application du catron, représentent seulement 1,6 fois les quantités de ^{3}H-DA recueillies dans les fractions précédant la superfusion avec la drogue. Par contre, le Catron$^{(R)}$ induit une augmentation très importante de la libération de la ^{3}H-DA, lorsque le noyau caudé est continuellement superfusé avec de la ^{3}H-tyrosine (fig. 28). Pendant la première application de Catron, la libération de la ^{3}H-DA est augmentée de 4 fois par rapport à la libération spontanée mesurée dans la fraction précédant le traitement. Cet effet est encore plus prononcé pendant la 2ème application. (La libération de ^{3}H-DA est 5 fois supérieure à la libération spontanée).

c - Discussion.

Nous retrouvons les effets déjà observés au cours de l'étude in vitro de la libération de la ^{3}H-DA. (Besson et coll., 1969).

Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus par Riddell et Szerb (1971) qui utilisant une "push-pull" canule, superfusent localement le noyau caudé avec un liquide physiologique contenant de la ^{14}C-tyrosine ou de la ^{14}C-DOPA. Ces auteurs observent une augmentation de la libération de la ^{14}C-DA, mais en utilisant une dose de Catron très élevée (1 mg/ml). La concentration de Catron employée dans nos expériences est 500 fois plus faible ; ceci révèle la grande sensibilité de notre technique.

D'autre part, le résultat essentiel qui apparaît à la suite de cette étude est que l'intensité de l'effet induit par le Catron dépend du site de stockage de la ^{3}H-DA. La drogue provoque une forte augmentation de la ^{3}H-DA néoformée mais modifie très peu la libération de la ^{3}H-DA lorsque celle-ci a été synthétisée et stockée depuis plus longtemps (2 heures). L'hypothèse d'une localisation de la ^{3}H-DA néoformée dans un site intraneuronal directement impliqué dans les processus de libération est donc confirmée par ces résultats.

2 - Libération de la ^{3}H-DA après inhibition de la synthèse du médiateur.

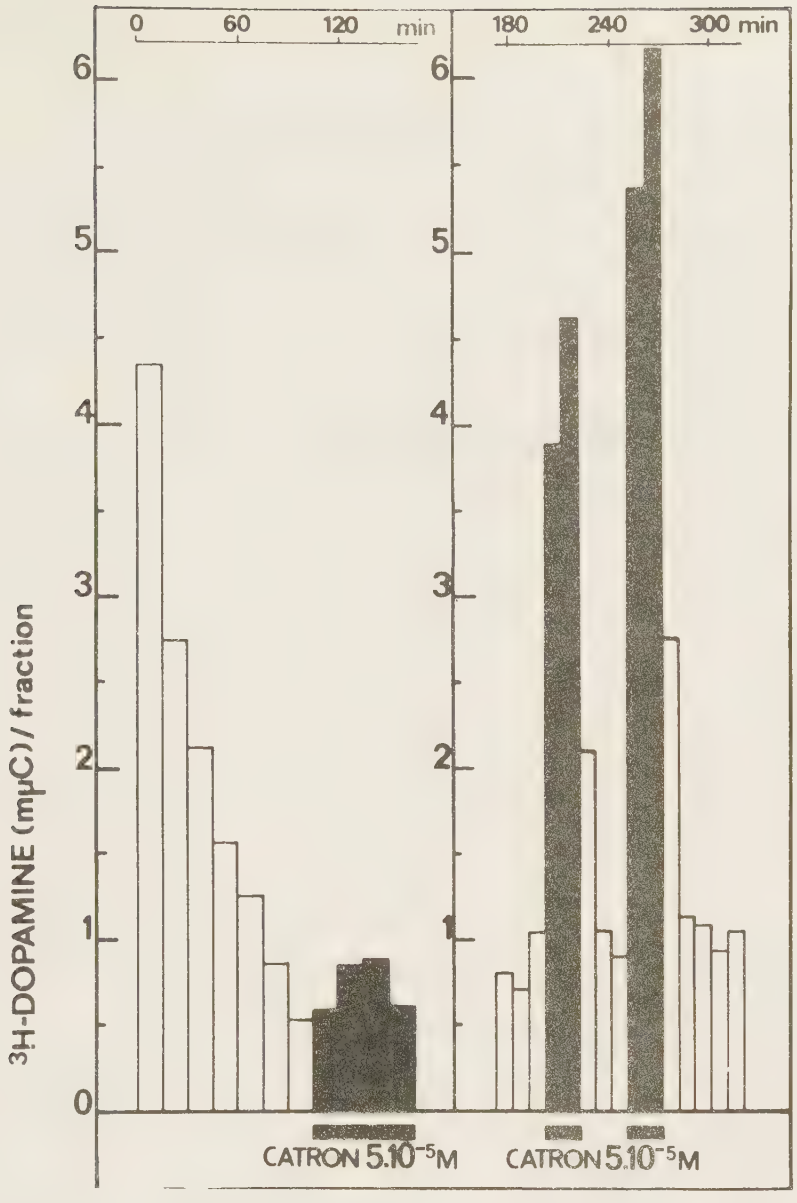


Fig.28 : Effet de la phéniprazine (Catron$^{(R)}$) sur la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée ou stockée depuis longtemps au niveau des terminaisons.

1) La partie gauche de la figure illustre les effets du Catron sur la libération de la ^{3}H-DA préalablement synthétisée à partir de ^{3}H-tyrosine. Les terminaisons dopaminergiques sont marquées pendant 30 min. avec de la ^{3}H-tyrosine (250 μCi).La surface du noyau caudé est ensuite superfusée avec un liquide physiologique collecté par fraction de 15 min. Le Catron est ajouté au liquide de perfusion (5×10^{-5}M) 105 min. après le début de la superfusion.

2) L'effet de l'application de Catron (5×10^{-5}M) sur la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée dans les terminaisons dopaminergiques continuellement marquées avec de la ^{3}H-tyrosine (30 μCi/ml) est représenté à droite. Dans ce cas les superfusats sont collectés par fraction de 10min.

a - Protocole expérimental.

La surface du noyau caudé est superfusée en continu avec de la ^{3}H-tyrosine. La synthèse de la DA est inhibée avec de l'α-mpT administrée deux heures après le début de la superfusion. La drogue est injectée intraveineusement (100 mg/kg) ou ajoutée au liquide de superfusion (10^{-4} M).

b - Résultats et discussion.

Immédiatement après l'administration d'αmpT (par voie intraveineuse, ou ajoutée au liquide de superfusion), la libération de la ^{3}H-DA est diminuée (table 23) en dépit de l'accumulation relativement importante de l'amine tritiée dans les tissus après ce temps de superfusion. La libération de la ^{3}H-DA est donc étroitement dépendante de sa synthèse, puisque dès que celle-ci est inhibée, la libération de la ^{3}H-DA diminue de façon très marquée. Ces résultats sont à nouveau en faveur du rôle prépondérant de la ^{3}H-DA néoformée dans les processus de libération.

3 - Effet de la d-amphétamine sur la libération de la ^{3}H-DA avant et après inhibition de la synthèse.

Nous avons examiné dans cette étude, si la d-amphétamine, comme le Catron, agit préférentiellement sur la libération de la DA néoformée.

Les effets de la d-amphétamine sont analysés avant et après inhibition de la synthèse de la ^{3}H-DA. Ce protocole est choisi, car certaines études comportementales ont montré que l'effet stimulant de l'amphétamine est aboli après inhibition de la synthèse des CA par l'αmpT (Weissman et coll., 1965, 1966 ; Hanson, 1967 ; Dominic et Moore, 1969).

a - Protocole opératoire.

La surface du noyau caudé, délimitée par la cupule, est continuellement superfusée avec un liquide physiologique contenant de la ^{3}H-tyrosine, et les superfusats sont collectés par fractions successives de 20 minutes. La d-amphétamine est ajoutée au liquide physiologique (10^{-6}M) pendant une fraction. Après un temps de récupération, l'αmpT est injectée à l'animal par voie intraveineuse, et l'effet de la d-amphétamine est à nouveau testé.

TABLE 23

Effet de l'∝MpT sur la libération de la ^{3}H-DA.

	numéro fraction	^{3}H-DA nCi/10 min.	% de diminution
I	9	1.5	
	10	1.6	M = 1.5
	11	1.6	
∝MpT 100 mg/kg i.v. →			
	12	1.0	- 35
	13	0.9	- 42
	14	0.6	- 61
II	9	1.9	
	10	2.1	
	11	2.0	M = 1.9
	12	1.8	
∝MpT (10^{-4}M) →			
	13	1.6	- 20
	14	0.9	- 55
	15	1.0	- 49
	16	0.7	- 65

Chez le chat non anesthésié, immobilisé avec du Flaxedil, la surface du noyau caudé est superfusée avec de la ^{3}H-tyrosine (40 µCi/ml - 6 ml/heure). La ^{3}H-DA collectée "en continu" est estimée dans les fractions successives de 10 minutes, pendant la synthèse normale de la ^{3}H-DA et immédiatement après l'injection intraveineuse d'∝MpT (100mg/kg I) ou après l'addition de la drogue (10^{-4}M - II) au liquide de superfusion. Le pourcentage de diminution de libération de la ^{3}H-DA est calculé par rapport à la moyenne des quantités de ^{3}H-DA libérée avant l'administration de l'∝MpT.

b - Résultats.

Les quantités de ^{3}H-DA libérées par la d-amphétamine sont environ 4 fois plus élevées que celles libérées spontanément dans les fractions précédant le traitement (fig. 29). Par contre, après inhibition de la synthèse de la ^{3}H-DA, la d-amphétamine a un effet moins marqué. La libération de la ^{3}H-DA induite par la d-amphétamine est seulement 1,6 fois plus élevée que la libération spontanée encore visible après inhibition de la synthèse de la ^{3}H-DA.

c - Discussion.

La d-amphétamine ajoutée au liquide physiologique en très faible concentration est capable, comme nous l'avons vu in vitro, d'augmenter la libération de la ^{3}H-DA. Cet effet a également été trouvé in vivo par d'autres chercheurs (Riddell et Szerb, 1971 ; Chiueh et Moore, 1973). Cependant ici encore les concentrations de d-amphétamine utilisées dans ces études sont respectivement 1000 à 100 fois plus élevées que celles employées dans nos expériences.

Nous avons également pu mettre en évidence une augmentation de la libération de la ^{3}H-DA en injectant par voie intraveineuse une faible dose de l-amphétamine afin de minimiser les effets périphériques habituellement provoqués par la d-amphétamine (Besson et coll., 1971 a).

Cette étude nous montre par ailleurs que la d-amphétamine a la possibilité de libérer préférentiellement la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée puisque son effet est beaucoup plus marqué pendant la synthèse du médiateur qu'après inhibition de celle-ci, même à un moment où les taux de ^{3}H-DA présente dans les tissus sont encore élevés (40 minutes après l'inhibition de synthèse).

L'action antiamphétaminique de l'αmpT peut alors être interprétée aisément : l'inhibiteur de synthèse abaisse immédiatement les taux de DA du petit compartiment ou "compartiment fonctionnel", continuellement entretenu par la synthèse et particulièrement sensible à l'action de la d-amphétamine. Ce mécanisme d'action est en accord avec les résultats obtenus par Scheel-Krüger (1971). Ce chercheur a montré dans une étude essentiellement comportementale que les stéréotypies induites par la d-amphétamine sont inhibées après une administration d'αmpT, mais peu affectées par une injection de réserpine, drogue qui agit peu sur le compartiment fonctionnel.

Le rôle limité du compartiment de stockage (^{3}H-DA stockée de-

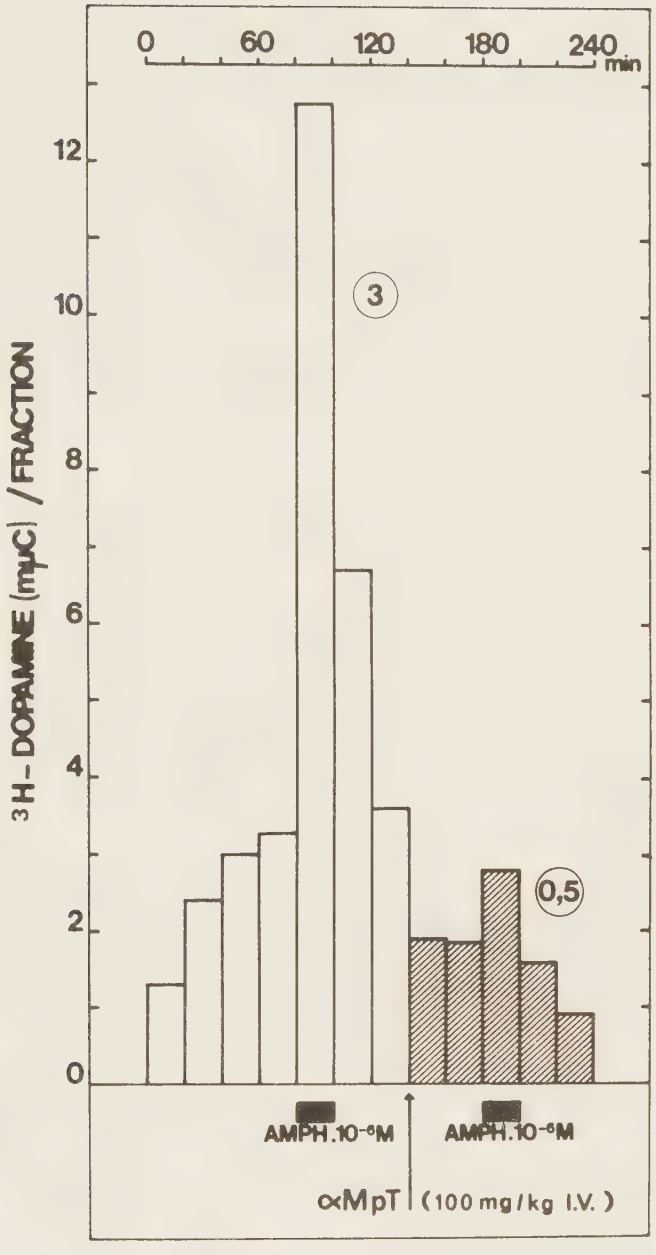


Fig.29 : Effet de l'amphétamine sur la libération de la ^{3}H-DA avant et après inhibition de la synthèse par l'∝mpT. La surface du noyau caudé, chez le chat non anesthésié, immobilisé avec du Flaxedil, est superfusée avec de la ^{3}H-tyrosine (40 μCi/ml). La ^{3}H-DA libérée, collectée continuellement, est estimée dans les fractions successives (20 min.) pendant la synthèse du médiateur et après l'injection intraveineuse d'∝mpT (100 mg/kg). L'amphétamine (10^{-6} M) est ajoutée au liquide de superfusion avant et après l'inbition de synthèse de la ^{3}H-DA.

puis longtemps dans les tissus) dans l'effet de l'amphétamine, est également souligné par les expériences de Moore (1973). Lorsque les terminaisons dopaminergiques sont préalablement marquées avec de la ^{3}H-DA exogène (qui se trouve très rapidement localisée dans le compartiment de stockage, Glowinski, 1967), l'addition d'αmpT (5×10^{-6}M) au liquide de superfusion ne modifie pas la libération de la ^{3}H-DA induite par l'amphétamine. La confrontation de ces différents résultats montrent que la d-amphétamine mobilise préférentiellement la DA localisée dans un compartiment immédiatement affecté par l'inhibition de synthèse.

4 - Effet d'un excés d'ions K^{+} sur la libération de la ^{3}H-DA avant et après inhibition de la synthèse.

Il nous a paru intéressant d'analyser si la libération induite de ^{3}H-DA faisait toujours intervenir préférentiellement la DA nouvellement synthétisée. Pour cela, les effets induits par un excés d'ions K^{+} ont été examinés en utilisant le même protocole que précédemment.

a - Protocole opératoire.

La surface du noyau caudé est superfusée en continu avec de la ^{3}H-tyrosine. Puis, 2h 1/2 après le début de la superfusion, un excés d'ions K^{+} (30 mM) est ajouté au liquide physiologique. Dans une autre expérience, la synthèse de la DA est inhibée par une injection intraveineuse d'αmpT (200 mg/kg) 3 heures après le début de la superfusion avec la ^{3}H-tyrosine. Les effets de l'addition d'ions K^{+} (30 mM) sont examinés pendant une fraction, et ceci est répété plusieurs fois.

b - Résultats.

Lorsque la synthèse de la DA est normale, l'addition d'ions K^{+} au liquide de superfusion provoque une augmentation de libération de la ^{3}H-DA qui est environ 10 fois supérieure au niveau de libération spontanée (fig. 30). Immédiatement après l'application d'ions K^{+}, les quantités de ^{3}H-DA retrouvées dans les superfusats décroissent rapidement et atteignent même un niveau inférieur à celui obtenu avant la dépolarisation.

Lorsque la synthèse de la ^{3}H-DA est inhibée (fig. 30), l'addition d'ions K^{+} au liquide de superfusion provoque toujours une augmentation très marquée de la libération de la ^{3}H-DA (environ 20 fois le niveau de libération spontanée). Une seconde application de K^{+} produit

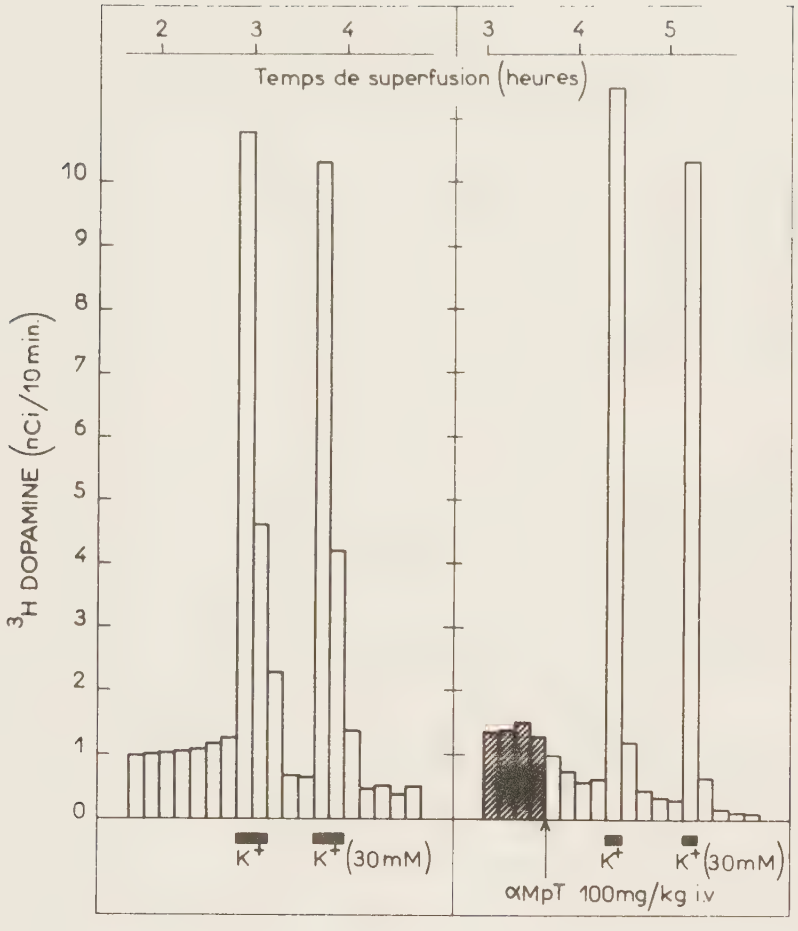


Fig.30 : Effet d'un excés d'ions K^+ sur la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthétisée ou stockée depuis longtemps au niveau des terminaisons.

La surface du noyau caudé est superfusée continuellement avec de la ^{3}H-tyrosine. Les superfusats sont collectés par fraction de 10 min. La partie gauche de la figure illustre les effets de l'application d'ions K^+ (30 mM) lorsque la synthèse de la ^{3}H-DA est normale. Les effets de l'addition d'ions K^+ (30 mM) sur la libération de la ^{3}H-DA lorsque la synthèse de l'amine a été inhibée préalablement par une injection i.v. d'αMpT (100 mg/kg) sont représentés dans la partie droite de la figure.

encore le même effet.

c - Discussion.

La dépolarisation induite par un excés d'ions K^+ augmente la libération de la ^{3}H-DA provenant du compartiment directement lié à la synthèse ainsi que du compartiment de "réserve". En effet, la libération de la ^{3}H-DA est très fortement augmentée par un excés d'ions K^+, même après inhibition de la synthèse de l'amine. Dans ce cas, à l'inverse des effets observés après addition d'amphétamine ou de Catron au liquide de superfusion, la ^{3}H-DA stockée depuis longtemps au niveau des terminaisons est libérée. Ces résultats soulignent la spécificité d'action de ces deux drogues qui libèrent préférentiellement l'amine nouvellement synthétisée.

5 - Discussion générale.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre montre que la ^{3}H-DA est localisée dans deux compartiments au moins. La ^{3}H-DA qui intervient en majorité dans les processus de libération, est directement dépendante de la synthèse de l'amine.

Des études biochimiques ou comportementales apportent des données complémentaires précisant le rôle fonctionnel des CA néoformées ou nouvellement captées par les tissus. Thierry et coll. (1970 - 1971) montrent que l'application de chocs électriques de faible intensité au niveau des pattes du rat, provoque une utilisation très rapide de la ^{3}H-NA nouvellement captée ou néoformée à partir de ^{3}H-tyrosine dans les neurones noradrénergiques du bulbe pont. Cet effet n'est plus détectable lorsque la ^{3}H-NA est captée ou synthétisée depuis longtemps dans les tissus.

D'autre part, le comportement d'autostimulation, obtenu après implantation d'une électrode au niveau de l'aire A10 (corps cellulaires dopaminergiques innervant le noyau accumbens et le tubercule olfactif ; fibres noradrénergiques ascendantes), est immédiatement diminué après l'injection d'αmpT (Stinus et coll., 1972). Ceci peut être attribué à l'utilisation et à la diminution très rapide des quantités de CA nouvellement synthétisées et libérées au niveau synaptique. L'utilisation préférentielle de l'une ou l'autre des formes de stockage de la DA est d'autre part mise en évidence par des expériences pharmacologiques. Nous avons montré que l'amphétamine comme le Catron$^{(R)}$ aug-

mente principalement la libération de la ^{3}H-DA néoformée. Ces résultats confirment l'hypothèse initialement proposée par Weissman et coll. (1966) pour interpréter l'effet "antiamphétamine" de l'αmpT observé dans des études comportementales. Toutes les drogues de type amphétaminique n'ont cependant pas le même mécanisme d'action. Des études comportementales faites après injection de méthyl phénidate par exemple (Scheel Krüger, 1971), révèlent au contraire l'utilisation préférentielle des CA du compartiment de "réserve".

En opposition avec ce que l'on observe dans des situations physiologiques ou certaines situations pharmacologiques, les ions K^{+} qui augmentent très fortement la libération de la ^{3}H-DA, affectent aussi bien la ^{3}H-DA néoformée que la ^{3}H-DA stockée depuis longtemps au niveau des terminaisons.

L'utilisation des deux formes de stockage des CA semble intervenir lorsqu'il y a une intense dépolarisation des neurones. Un effet similaire est observé lors d'une activation prononcée des neurones. Par exemple, un stress de longue durée (3 heures) augmente l'utilisation de la ^{3}H-NA stockée depuis longtemps dans les tissus cérébraux (Thierry et coll., 1968 ; Schilkraut et coll., 1971).

Cette étude souligne l'intérêt de la superfusion en continu avec de la ^{3}H-tyrosine, pour étudier les caractéristiques de la libération de la ^{3}H-DA.

VI - INFLUENCE DE L'ACTIVITE NERVEUSE SUR LA LIBERATION DE LA ^{3}H-DA.

Après avoir défini les conditions optimales à l'étude de la libération de la ^{3}H-DA et étudié les caractéristiques de la libération spontanée de cette amine, nous avons essayé de mettre en évidence l'influence de l'activité nerveuse sur la libération de la ^{3}H-DA. En effet, l'intensité de la libération de la ^{3}H-DA, comme celle de tout médiateur chimique doit théoriquement dépendre du niveau d'activité des neurones dopaminergiques.

Dans cette étude, nous avons tenté d'inhiber ou d'activer la voie dopaminergique nigro-striatale.

- L'application de tétrodotoxine et la section de la voie nigro-striatale nous ont permis de réduire l'activité neuronale.

- La stimulation directe des corps cellulaires des neurones nigro-striataux ainsi que la stimulation d'autres régions mésencéphaliques ont été utilisés afin d'activer les neurones dopaminergiques.

1 - Libération de la ^{3}H-DA après arrêt de l'activité neuronale. Effet de la tétrodotoxine et de la section de la voie nigro-striatale.

a - Protocole opératoire.

La surface ventriculaire du noyau caudé, délimitée par la cupule, est continuellement superfusée avec de la ^{3}H-tyrosine. La ^{3}H-DA libérée est mesurée dans les fractions successives de superfusat.
Dans une première série d'expérience, la tétrodotoxine (TTX) est ajoutée pendant 30 minutes au liquide de superfusion (10^{-5} g/ml).
Dans une seconde série expérimentale, une transection est effectuée avec une spatule métallique (6 cm de largeur) introduite dans le cerveau aux coordonnées suivantes (A = 7 ; L = 1 à 7 ; H = -5 selon le repérage de l'atlas de Jasper et Ajmone Marsan). La transection est réalisée 2 heures après le début de la superfusion.

b - Résultats.

L'addition de TTX au liquide de superfusion provoque une baisse importante (65 %) et immédiate de la libération de la ^{3}H-DA (fig. 31). Cet effet est de longue durée, puisque 40 minutes après que la drogue soit éliminée du liquide de superfusion, la libération de la ^{3}H-DA est toujours diminuée.

D'autre part, la section des fibres afférentes au noyau caudé et en particulier la section de la voie nigro-striatale, provoque une chute immédiate de la libération de la ^{3}H-DA (fig. 31). Vingt minutes après la transection, la libération de la ^{3}H-DA n'est plus détectable. Les valeurs obtenues sont au niveau du blanc qui correspond à la radioactivité résiduelle due à la contamination par la ^{3}H-tyrosine.

c - Discussion.

Les deux résultats obtenus démontrent clairement que la libération de la ^{3}H-DA mesurée est dépendante de l'activité nerveuse. Il est cependant difficile de dire précisément, si la libération de la ^{3}H-DA est uniquement tributaire de l'activité des neurones nigro-striataux ou si elle est également contrôlée par d'autres systèmes neuronaux. En effet, la TTX qui bloque l'activité nerveuse en interférant avec le transport du sodium (Narahashi et coll., 1964), inhibe l'arrivée des influx nerveux au niveau de toutes les terminaisons du noyau caudé. D'autre part, la section ne permet pas de léser exclusivement les neurones dopaminergiques nigro-striataux. Néanmoins, ces résultats révèlent que dans les conditions normales, la ^{3}H-DA retrouvée dans les superfusats ne correspond pas à un processus de diffusion, mais est libérée spontanément sous l'influence d'une activité nerveuse de base continuellement entretenue. L'activité de base des neurones dopaminergiques est elle-même vraisemblablement modulée par d'autres systèmes de neurones. (Yoshida et Precht, 1971)

2 - Effet de la stimulation de la substance noire.

a - Protocole opératoire.

Deux électrodes bipolaires concentriques sont implantées dans deux régions distinctes de la substance noire (A = 5, L = 2 - 2,5 ; A = 4, L = 4 - 4,5). Un repérage électrophysiologique est réalisé pendant la mise en place de ces électrodes. L'électrode localisée à la latéralité L = 4, est descendue jusqu'à ce que la réponse somatosensorielle enregistrée au niveau du lemnisque médian ne soit plus visible. L'électrode implantée à la latéralité L = 2,5 est descendue en repérant l'activité caractéristique des cellules du noyau rouge. La fréquence de stimulation généralement utilisée est de 20 Hz. Les caractéristiques de la stimulation sont les suivantes : un train d'impulsions de 4 chocs dont la fréquence est de 200 Hz, chaque choc ayant une du-

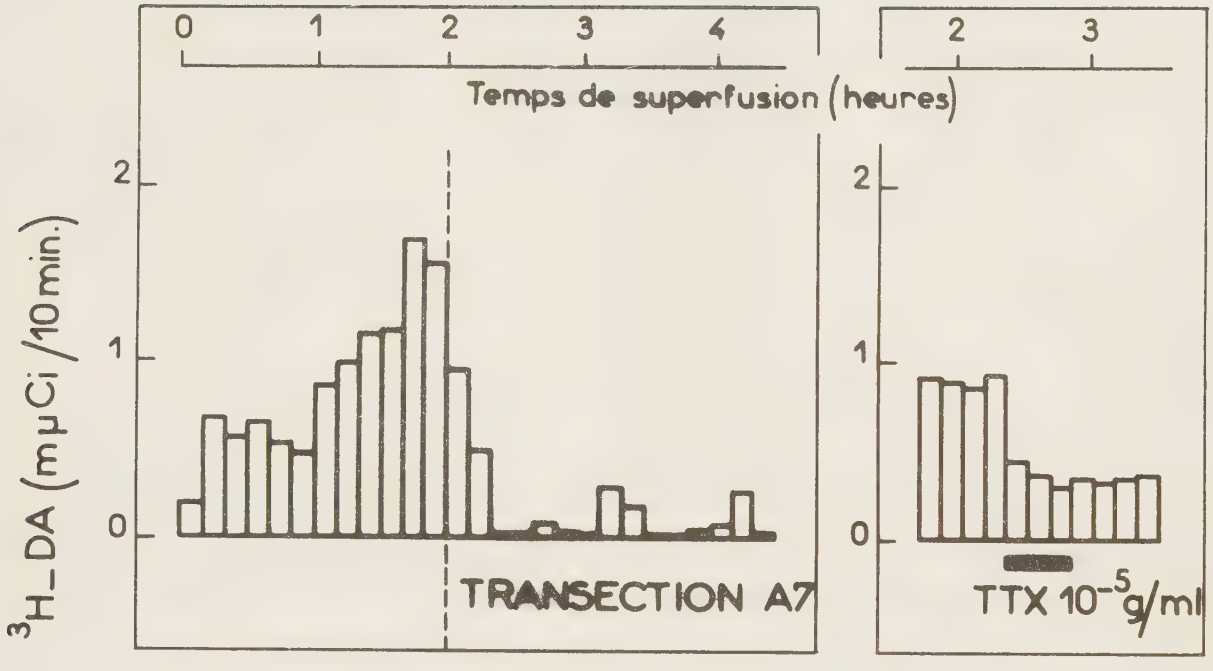


Fig.31 : Effets de la transection de la voie nigro-striatale et de l'application de tétrodotoxine sur la libération de la ^{3}H-DA.

La ^{3}H-DA est estimée dans les fractions collectées successivement au cours de la superfusion continue de la surface du noyau caudé, avec de la ^{3}H-tyrosine (40 μCi/ml). La transection est effectuée avec une spatule métallique descendue dans le cerveau aux coordonnées suivantes (A = 7 ; L = 1 à 7 ; H = -5). La partie droite de la figure illustre l'effet de l'addition de tétrodotoxine (TTX) au liquide de superfusion (10^{-5}g/ml) sur la libération spontanée de la ^{3}H-DA.

rée de 0,5 msec et une intensité de 80 µA, le passage du courant se faisant de la pointe vers l'anneau de l'électrode bipolaire. Dans quelques expériences, nous avons essayé de stimuler la substance noire, en faisant passer le courant entre les deux électrodes bipolaires.

b - Résultats.

L'analyse des différents résultats obtenus, révèle que pendant la stimulation de la substance noire, les quantités de ^{3}H-DA libérées ne sont pas significativement augmentées par rapport à celles détectées pendant la libération spontanée (fig. 32). Par contre, immédiatement après cessation de la stimulation, les quantités de ^{3}H-DA libérées sont augmentées significativement de 50 %. Les résultats ne semblent pas dépendre de la localisation des électrodes dans la substance noire (SN).

c - Discussion.

Il est assez surprenant de voir que la libération de la ^{3}H-DA est augmentée significativement uniquement après la stimulation de la SN. Ces résultats ne sont cependant pas en désaccord avec ceux obtenus par d'autres groupes de chercheurs qui ont essayé de modifier l'activité des neurones dopaminergiques en stimulant directement la substance noire. En effet, Portig et Vogt (1968 - 1969) perfusant le ventricule latéral, mesurent la libération de la DA pendant la stimulation de la substance noire. Les résultats généralement obtenus sont très variables, et souvent les quantités de DA libérées sont à la limite de détection de la technique de dosage utilisée. Par contre, le métabolite principal de la DA, l'acide homovanilique, est en concentration plus élevée pendant et après la stimulation de la substance noire (Portig et Vogt, 1969).

Von Voigtlander et Moore (1971 b) en marquant préalablement le noyau caudé avec de la ^{3}H-DA exogène, trouvent également une très faible augmentation de la libération de la ^{3}H-DA (+ 25 %) dans des conditions de stimulation assez voisines (30 Hz, 200 µA ; 1 msec) de celles que nous avons utilisées. De même, Riddell et Szerb (1971) montrent que la stimulation au niveau des corps cellulaires augmente très faiblement la libération de la DA radioactive synthétisée endogènement à partir de ses précurseurs marqués.

La stimulation de la substance noire ne semble donc pas très efficace pour provoquer une libération nette de la DA. Les résultats

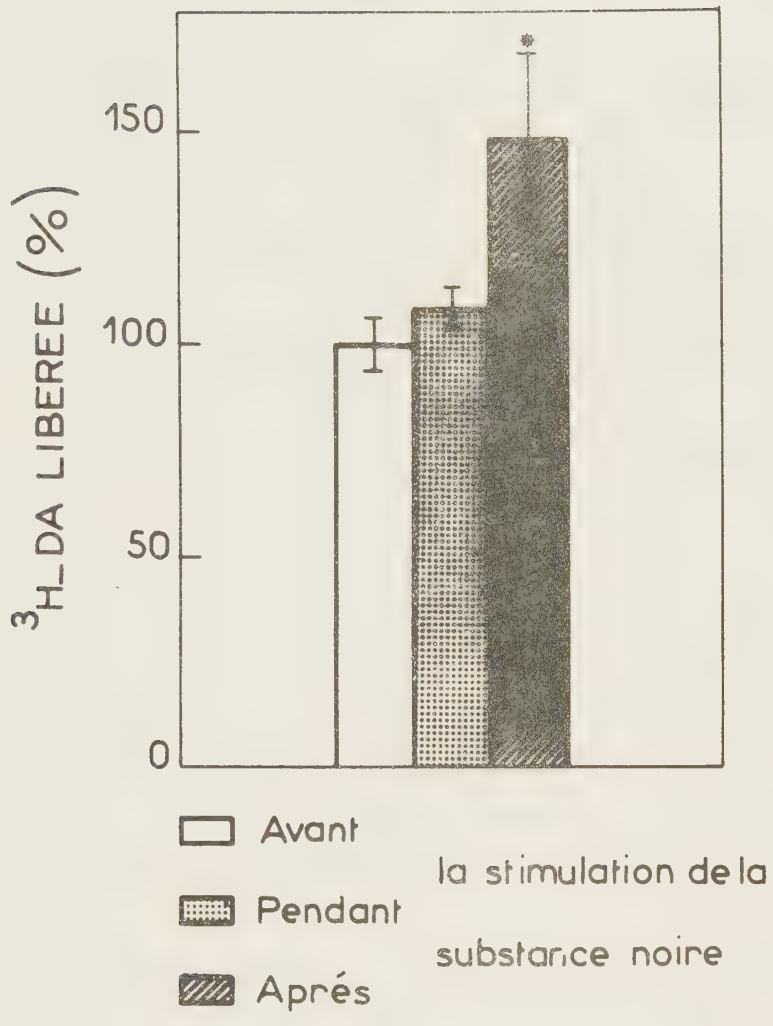


Fig.32 : Effet de la stimulation de la substance noire sur la libération de la ^{3}H-DA.

Au cours de la superfusion continue du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine, la substance noire est stimulée à l'aide d'une électrode bipolaire concentrique (trains d'impulsions de 4 chocs - 0,5 msec de durée - fréquence 200Hz. , appliquées à 20 c/sec.). La ^{3}H-DA est mesurée dans les fractions de 10 min. collectées avant, pendant et après la stimulation. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux quantités de ^{3}H-DA libérées dans la fraction précédant la stimulation et correspondent à la moyenne des valeurs obtenues avec 15 expériences de stimulation. Seules, les quantités de ^{3}H-DA libérées après la stimulation sont significativement augmentées.

* $P < .05$.

que nous avons obtenus laissent supposer que pendant la stimulation de la substance noire, d'autres systèmes de neurones peuvent également être stimulés soit orthodromiquement ou antidromiquement et provoquer un blocuage au niveau des terminaisons dopaminergiques. Il est également possible que la dépolarisation créée au niveau de la substance noire, provoque localement la libération d'autres médiateurs contrôlant l'activité des neurones dopaminergiques. En particulier, il est tentant de postuler que le GABA intervient à ce niveau. En effet, le GABA trouvé en forte concentration dans la substance noire (Okada et coll., 1971), est principalement localisé à ce niveau dans des terminaisons nerveuses. L'existence de celles-ci, suggérée par des expériences de lésions (Kim et coll., 1971 ; Mc Geer et coll., 1971), vient d'être mise en évidence dans des études autoradiographiques réalisées en microscopie électronique (Hattori et coll., 1973). Très certainement, le GABA exerce un contrôle inhibiteur au niveau de la substance noire. En effet, la réduction de l'activité des cellules nigrales observée après stimulation du noyau caudé (Precht et Yoshida, 1971) ou injection de gamma hydroxybutyrate (Walters et coll., 1972) est attribuée à une action du GABA au niveau de ces cellules.

3 - Effets de la stimulation de certaines régions mésencéphaliques.

A titre indicatif, il nous a paru intéressant d'inclure dans cette présentation une étude réalisée en collaboration avec Madame Albe-Fessard. Cette étude, bien que préliminaire, est néanmoins intéressante parce qu'elle montre des relations possibles du système dopaminergique nigro-striatal avec d'autres systèmes de neurones.

a - Protocole opératoire.

Les effets de la stimulation de la formation réticulée mésencéphalique (A = 3, L = 4, H = -1) et du noyau rouge (A = 4, L = 1,5, H = -4) ont été analysés au cours d'expériences de superfusion du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine.

b - Résultats.

Malgré le petit nombre d'expériences que nous avons pu faire, la stimulation de la formation réticulée a induit dans 2 expériences sur 4 une augmentation de la libération de la ^{3}H-DA (table 24). D'autre part, la stimulation du noyau rouge a entraîné dans 1 expérience sur 2, une augmentation de la libération de la ^{3}H-DA de 100 %.

TABLE 24

Effets de la stimulation de la formation réticulée mésencéphalique et du noyau rouge sur la libération de la ^{3}H-DA.

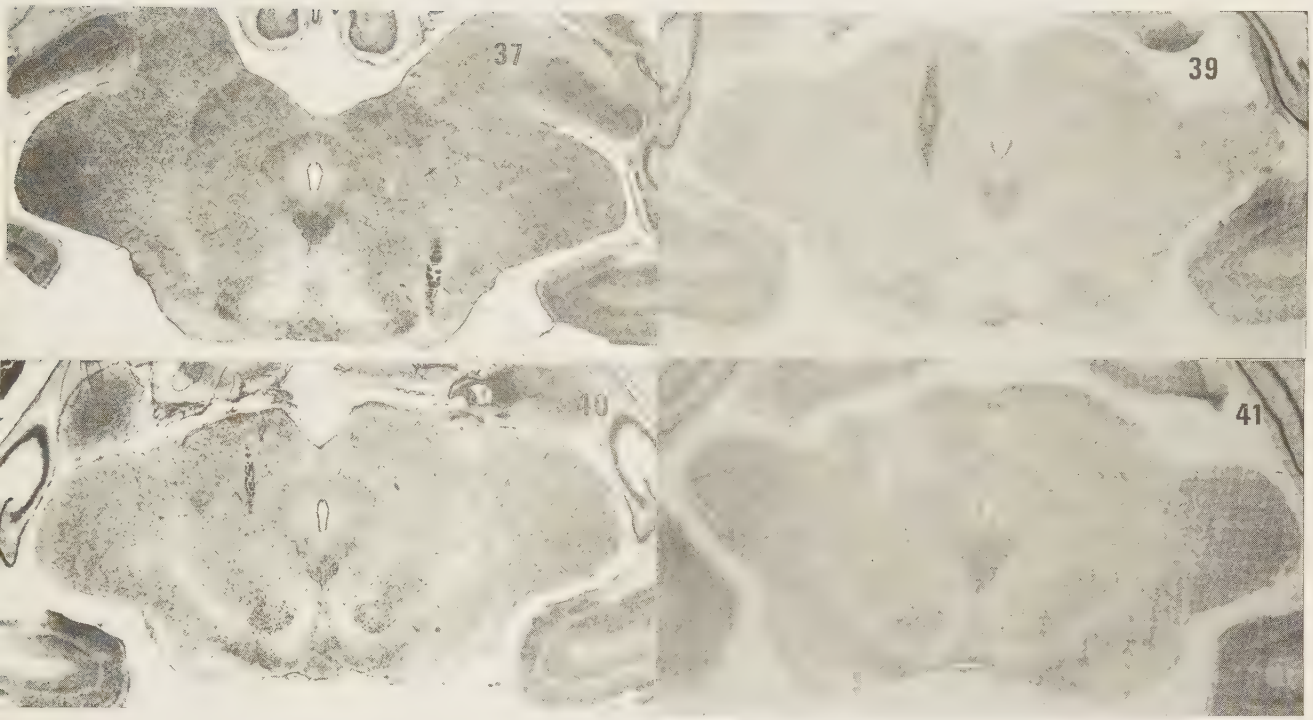
			^{3}H-DA libérée mμCi/fraction de 5 min.		
Structure Stimulée	**numéro expérience**	**Voltage (V)**	Avant	Pendant	Après
F.R.M	A = 4 L = 2 H = -1	37	5 5	0,24 0,19	0,54 * 0,45 *	0,64 * 0,47 *
F.R.M	A = 4 L = 2 H = -0,6	39	5 5	0,35 0,34	0,35 0,46	0,37 0,42
F.R.M	A = 3 L = 4 H = -1	40	5 7,5	0,39 0,94	0,50 * 3,44 *	1,17 * 1,84 *
F.R.M	A = 3 L = 4 H = -1	41	5 7,5	0,44 0,43	0,51 0,39	0,60 0,42
N.R	A = 4 L = 1,5 H = -4	40	5	1.08	2.18 *	0.95 *
N.R	A = 4,5 L = 2	41	5	0.51	0.49	0.51

Légende de la table 24.

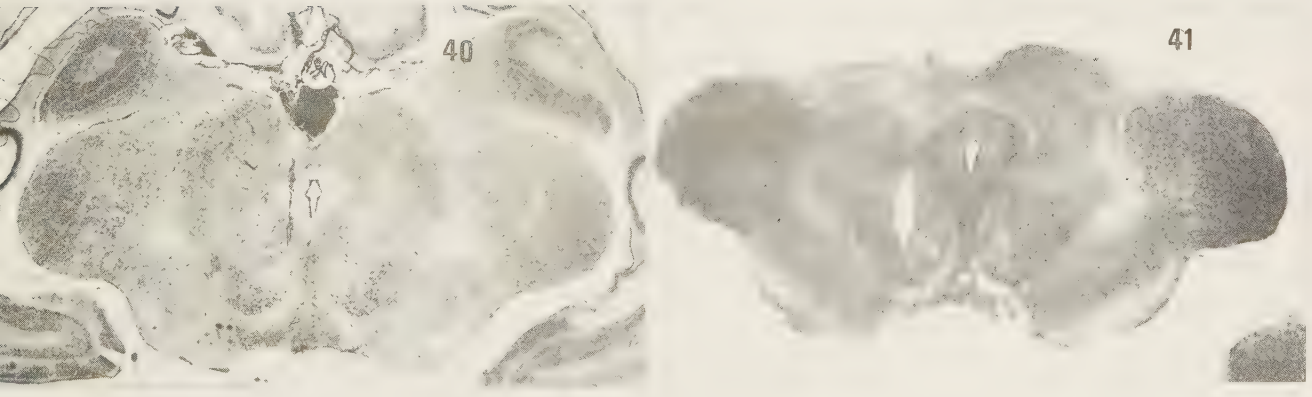
La surface du noyau caudé est superfusée continuellement avec de la ^{3}H-tyrosine, et la ^{3}H-DA libérée est mesurée dans les fractions successives collectées toutes les 5 minutes. La stimulation de la formation réticulée mésencéphalique (F.R.M) ou du noyau rouge (N.R) est effectuée aux coordonnées indiquées, à l'aide d'une électrode bipolaire concentrique. (trains d'impulsions de 4 chocs appliqués à la fréquence de 20 c/sec. - durée d'un choc 0,5 msec. - fréquence des chocs 200 c/sec. - le voltage est indiqué dans la table).
Seules sont données, las valeurs de ^{3}H-DA mesurées avant, pendant et après la stimulation.
Les astérisques * indiquent une augmentation importante de la libération de la ^{3}H-DA (100 à 200 %).

CONTROLES HISTOLOGIQUES DES POINTS DE STIMULATION

FORMATION RETICULEE



NOYAU ROUGE



(table 24). D'après les coupes histologiques effectuées pour déterminer l'emplacement exact des électrodes, il apparaît que la stimulation du noyau rouge a provoqué une augmentation de la libération de la ^{3}H-DA lorsque l'électrode était placée du côté de la ligne médiane légèrement à l'extérieur du noyau rouge. Par contre, la stimulation par l'intermédiaire d'une électrode placée juste au centre du noyau rouge a été inefficace.

c - Discussion.

Ces résultats préliminaires suggèrent l'existence possible d'un contrôle de la libération de la ^{3}H-DA par la formation réticulée. D'autre part, des circuits neuronaux faisant intervenir le noyau rouge peuvent être impliqués dans le contrôle de la libération de la DA (Larochelle et coll., 1970). Il apparaît cependant plus vraisemblable que ce soit la stimulation directe de fibres nigro-striées localisées au voisinage du noyau rouge (Moore et coll., 1971) qui induise une augmentation immédiate et importante de la libération de la ^{3}H-DA. En effet, la stimulation directe des fibres semblent plus efficace pour induire une augmentation de la libération de la DA. Ainsi, Von Voigtlander et Moore (1972 a) ont pu obtenir une libération évoquée de la ^{3}H-DA en stimulant la voie nigro-striatale dopaminergique au niveau de l'aire hypothalamique latérale.

4 - Conclusion.

La libération spontanée de la ^{3}H-DA mesurée in vivo au niveau du noyau caudé du chat, est dépendante d'une activité neuronale de base des neurones dopaminergiques nigro-striataux comme l'indiquent les résultats obtenus après une transection ou l'application locale de TTX.

Par ailleurs, une augmentation de libération de la ^{3}H-DA induite par activation des neurones dopaminergiques est visible en stimulant directement les fibres, mais par contre difficilement détectable par stimulation de la substance noire. Ceci pourrait être attribué à la libération locale de substances exerçant un contrôle inhibiteur sur les neurones dopaminergiques. Des injections localisées de substances pharmacologiques dans la substance noire, permettront peut être de préciser le rôle de différents systèmes de neurones et notamment des neurones gabaminergiques.

D'autre part, au niveau du noyau caudé, la libération de la DA et très certainement contrôlée par des afférences provenant de la formation réticulée mésencéphalique comme le suggèrent les expériences préliminaires que nous avons décrites dans ce travail.

VII - ETUDES SIMULTANEES DE LA SYNTHESE ET DE LA LIBERATION DE LA ^{3}H-DA.

Dans cette étude, nous abordons un nouveau développement de la technique de superfusion du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine. Nous avons tenté d'examiner simultanément la libération de la ^{3}H-DA et ses relations avec les processus de synthèse.

Au cours des études faites "in vitro", nous avions observé que les échanges d'eau s'effectuaient très rapidement entre les tissus et le liquide d'incubation. C'est pourquoi, nous avons essayé d'adapter "in vivo" la technique de mesure de la synthèse de la ^{3}H-DA, en dosant l'^{3}H-H_2O contenue dans les superfusats. Cette mesure ne permet pas de connaître le taux absolu de conversion de la L-3-5 ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA, puisqu'une partie seulement de l'^{3}H-H_2O formée diffuse dans les superfusats. Elle donne néanmoins un bon index des variations de synthèse de la ^{3}H-DA survenant au cours d'une expérience.
Les modifications simultanées de la synthèse et de la libération du médiateur ont été examinées dans plusieurs situations. Nous avons particulièrement examiné :

1) L'influence d'un inhibiteur de la synthèse de la DA (αmpT); ces résultats nous ont permis de vérifier la spécificité de la formation de l'^{3}H-H_2O.

2) Les effets de modifications de l'activité des neurones nigro-striataux. Une diminution de l'activité neuronale est obtenue par une section de la voie nigro-striatale ; l'augmentation de l'activité est obtenue de façon indirecte, en injectant un neuroleptique, la thiopropérazine qui augmente l'activité des neurones nigro-striataux par un mécanisme inter-neuronal.

3) L'influence de drogues qui affectent les mécanismes d'inactivation de la DA : un inhibiteur des processus de recapture, et un inhibiteur de la mono-amino-oxydase.

A - Effet d'un inhibiteur de synthèse : l'αmpT.

a - Protocole expérimental.

Deux heures après le début de la superfusion avec la ^{3}H-tyrosine, l'αmpT est ajoutée au liquide de superfusion (10^{-4}M) de façon à induire le plus rapidement possible une inhibition de synthèse de la DA.

L'^3H-H_2O est mesurée dans les fractions successives de superfusat de la facon suivante : le volume de chaque superfusat est ajusté à 2 ml avec de l'eau distillée. Une partie aliquote (0,2 ml) est prélevée, diluée dans 1,8 ml d'eau, puis distillée selon le protocole utilisé dans les études "in vitro". La radioactivité contenue dans 0,5 ml de distillat est déterminée à l'aide d'un mélange scintillant Instagel(R) (10 ml) ou Toluène-POPOP-PPO-Triton (10 ml). La valeur du blanc (représentant la contamination due à la ^3H-tyrosine) est déterminée sur des échantillons non superfusés de liquide physiologique contenant de la ^3H-tyrosine. Généralement les quantités de ^3H-H_2O mesurées dans les superfusats sont 6 à 10 fois supérieures à celles du blanc.
La ^3H-DA contenue dans les 1,8 ml de superfusat non utilisés est ensuite mesurée.

b - Résultats et discussion.

Dans la plupart des cas, les quantités d'^3H-H_2O collectées augmentent rapidement, puis atteignent un niveau qui fluctue peu en fonction du temps de superfusion (fig. 33). Ceci suggère que le compartiment de tyrosine impliqué dans la synthèse de la DA est assez petit et que de ce fait l'activité spécifique de la tyrosine dans ce compartiment atteint rapidement un état stable.

La formation de l'^3H-H_2O est immédiatement réduite après l'addition d'αmpT au liquide de superfusion. Après une heure de superfusion avec l'inhibiteur, les quantités d'^3H-H_2O ne représentent plus que 30 % de celles détectées avant l'addition de la drogue. Une restauration progressive de la formation de l'^3H-H_2O est obtenue, après omission de la drogue (fig.33).

Ces résultats révèlent que la formation de l'^3H-H_2O reflète spécifiquement la vitesse de transformation de la ^3H-tyrosine en ^3H-DOPA comme nous l'avons observé au niveau des coupes de striatum du rat (Besson et coll., 1971 b).
L'allure de la courbe de libération de la ^3H-DA suit très étroitement celle de la formation d'^3H-H_2O. L'inhibiteur de synthèse réduit très rapidement (20 minutes) la libération spontanée de la ^3H-DA d'environ 50 %. La libération de la ^3H-DA devient à peine détectable une heure après l'introduction de l'αmpT dans le liquide de superfusion. Une libération normale est à nouveau observée 90 minutes après ommission de l'inhibiteur. Ces résultats mettent à nouveau en évidence la relation

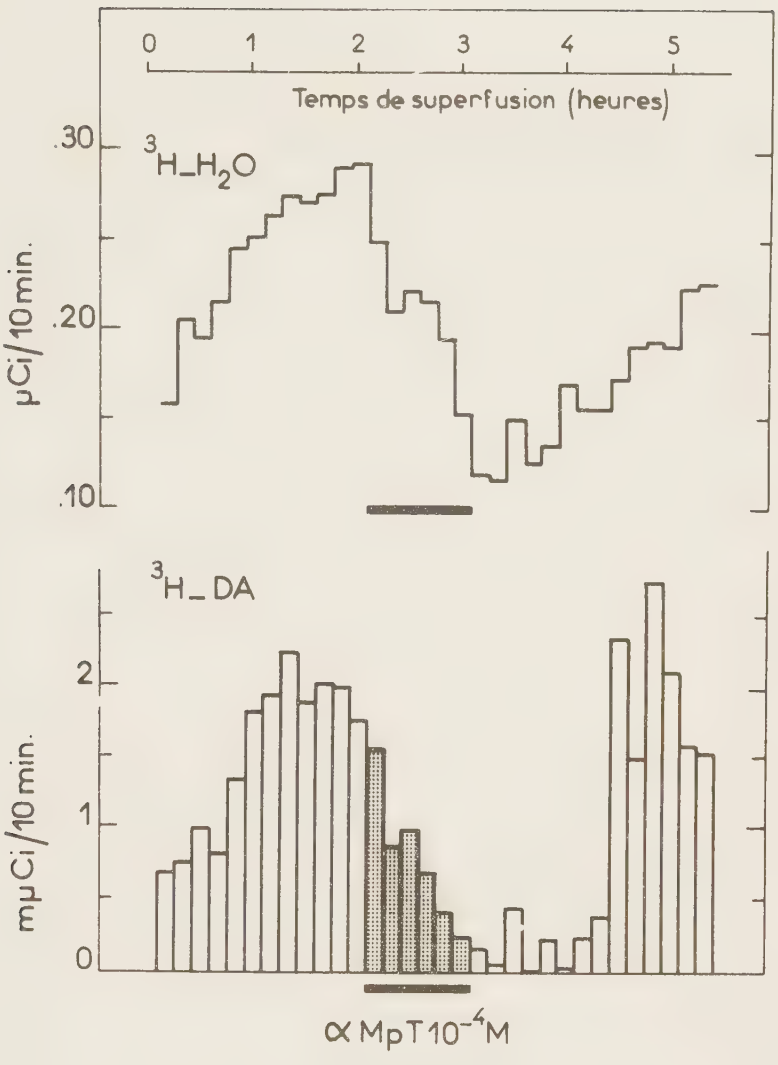


Fig.33 : Effet de l' MpT sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA formée à partir de ^{3}H-tyrosine.

La surface du noyau caudé, délimitée par une cupule est superfusée continuellement avec un liquide physiologique contenant de la L, 3-5, ^{3}H-tyrosine (40 µCi/ml ; 1 ml/10 min.). L'∝MpT (10^{-4}M) est ajoutée au liquide de superfusion pendant 1 heure (barre noire). Les quantités de ^{3}H-DA (en bas de la figure) et d'^{3}H-H_2O (en haut de la figure) sont mesurées dans les fractions collectées successivement toutes les 10 minutes.

étroite qui existe entre le processus de synthèse et celui de la libération.

B - Influence de l'activité nerveuse.

1 - Effet d'une transection.

La section de la voie nigro-striatale est réalisée, en utilisant la même technique que celle décrite précédemment, aux coordonnées suivantes (A = 7 ; L = 1 à 7 ; H = -5).

Immédiatement après la transection, la libération de la ^{3}H-DA est très nettement diminuée, comme nous l'avons déjà indiqué. Par contre, les quantités d'^{3}H-H_2O collectées décroissent très lentement en fonction du temps de superfusion (30 % de diminution en 2 heures) (fig. 34). Le taux de transformation de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA est donc peu affecté. Ceci suggère que la synthèse de la DA n'est que partiellement dépendante de l'activité neuronale.

A la périphérie, Sedvall et coll. (1969) ont également montré que la décentralisation aigue des neurones noradrénergiques entraîne une inhibition relativement faible de la transformation de la ^{14}C tyrosine en ^{14}C NA.

Par contre, Kehr et coll. (1972) en mesurant l'accumulation de DOPA après inhibition de la DOPA décarboxylase, observent une augmentation de la synthèse de la DA au niveau du striatum du rat immédiatement après une hémitransection. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par Javoy et coll. (1973), après une lésion électrolytique ou chimique de la substance noire du rat. Ces effets ont été attribués à une régulation rapide de la synthèse induite par les modifications de concentrations synaptiques du médiateur au niveau de sites récepteurs présynaptiques.

Il reste à définir si cet effet est spécifique de l'espèce animale utilisée, ou si des mécanismes de régulation différents sont mis en jeu chez l'animal anesthésié et l'animal éveillé.

2 - Effet de l'administration de Thiopropérazine.

a - Protocole opératoire.

La TZ est administrée à l'animal par voie intraveineuse (10 mg/kg) environ deux heures après le début de la superfusion du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine.

Des expériences complémentaires sont également réalisées, afin de préciser le mécanisme d'action de la TZ. Pour cela, les effets

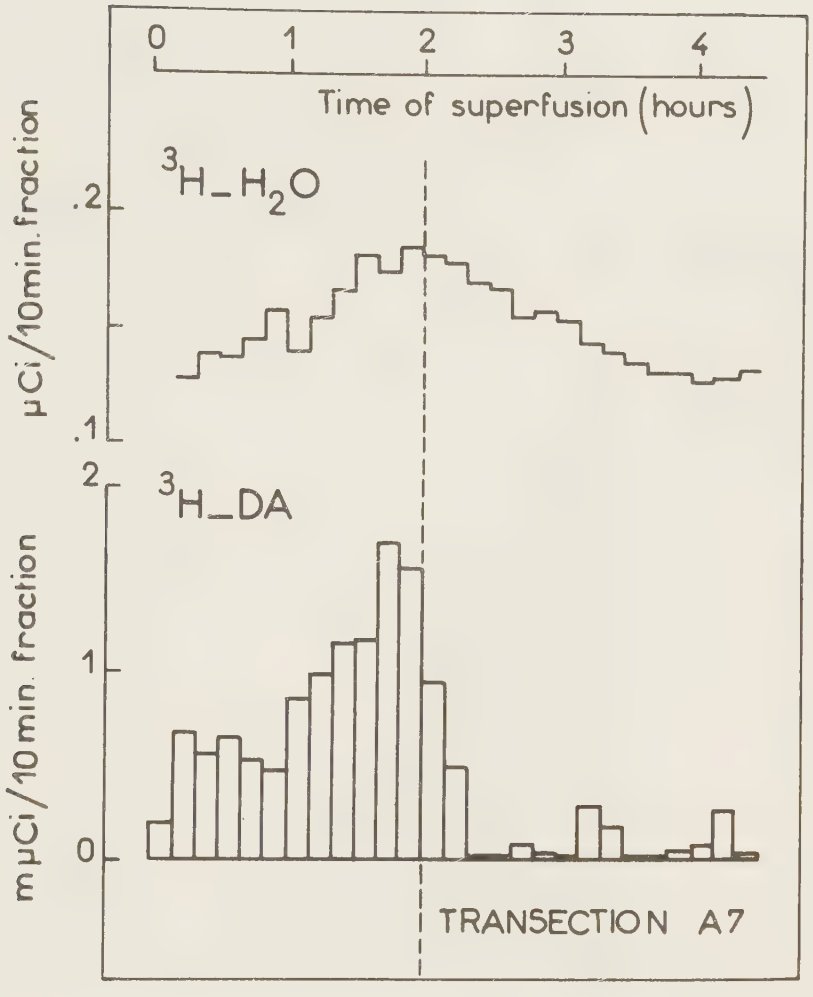


Fig.34 : Effet de la transection de la voie nigro-striatal sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA.

2 heures après le début de la superfusion de la surface du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine, une transection de la voie nigro-striatale est réalisée à l'aide d'une spatule métallique descendue au coordonnées suivantes : A = 7 ; L = 1 à 7 ; H = -5. Les quantités de ^{3}H-DA et de ^{3}H-H_2O sont mesurées dans les fractions de 10min. collectées successivement.

de la TZ injectée par voie intraveineuse sont analysés après avoir réalisé une section de la voie nigro-striatale. Par ailleurs, l'effet de la TZ ajoutée dans le liquide de superfusion (10^{-6}M) pendant plusieurs fractions est également testé.

b - Résultats et discussion.

L'injection de TZ induit une augmentation progressive de la libération de la ^{3}H-DA. Deux heures après l'administration de la drogue, la libération de la ^{3}H-DA est augmentée de 150 % par rapport à la libération spontanée obtenue avant le traitement (fig. 35). Parallèlement un accroissement du taux de formation de l'^{3}H-H_2O est observé (fig. 35). Ceci indique une stimulation de la synthèse de la ^{3}H-DA. De fait, deux heures après l'administration de la drogue, l'augmentation de synthèse est d'environ 70 %. Ces données confirment les résultats obtenus "in vitro" (Cheramy et coll. 1970 ; Besson et coll. 1971 b) sur des coupes de striatum de rats prétraités avec cette drogue.

Les effets de la TZ ne sont plus observés, si la voie nigro-striatale est sectionnée (fig. 36). Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse d'une activation interneuronale induite par la TZ. Ce processus d'activation des neurones dopaminergiques nigro-striataux par les neuroleptiques a d'ailleurs été démontré très élégamment au cours d'études pharmacologiques (Anden et coll., 1971) et biochimiques (Nybäck et Sedvall, 1971) faites immédiatement ou quelques jours après la lésion de la voie nigro-striatale.

Un autre mécanisme de régulation intervenant directement au niveau des terminaisons dopaminergiques pourrait également être mis en jeu après administration de neuroleptiques, comme le suggèrent les expériences de Farnebo et Hamberger (1971). Au niveau de coupes de striatum de rat , la libération de ^{3}H-DA induite par un champ électrique est augmentée lorsque la chlorpromazine est ajoutée au liquide de superfusion. Cependant dans nos expériences, l'addition de TZ (10^{-6}M) n'a pas modifié la libération spontanée de la ^{3}H-DA ainsi que sa synthèse (fig. 36). Ceci suggère que les mécanismes de régulation locaux de la libération de la DA sont mis en jeu uniquement lorsque la libération est fortement augmentée. La stimulation des terminaisons dopaminergiques ou l'activation pharmacologique de la libération de la DA induite par des drogues telles que l'amphétamine peuvent provoquer un tel mécanisme de régulation.

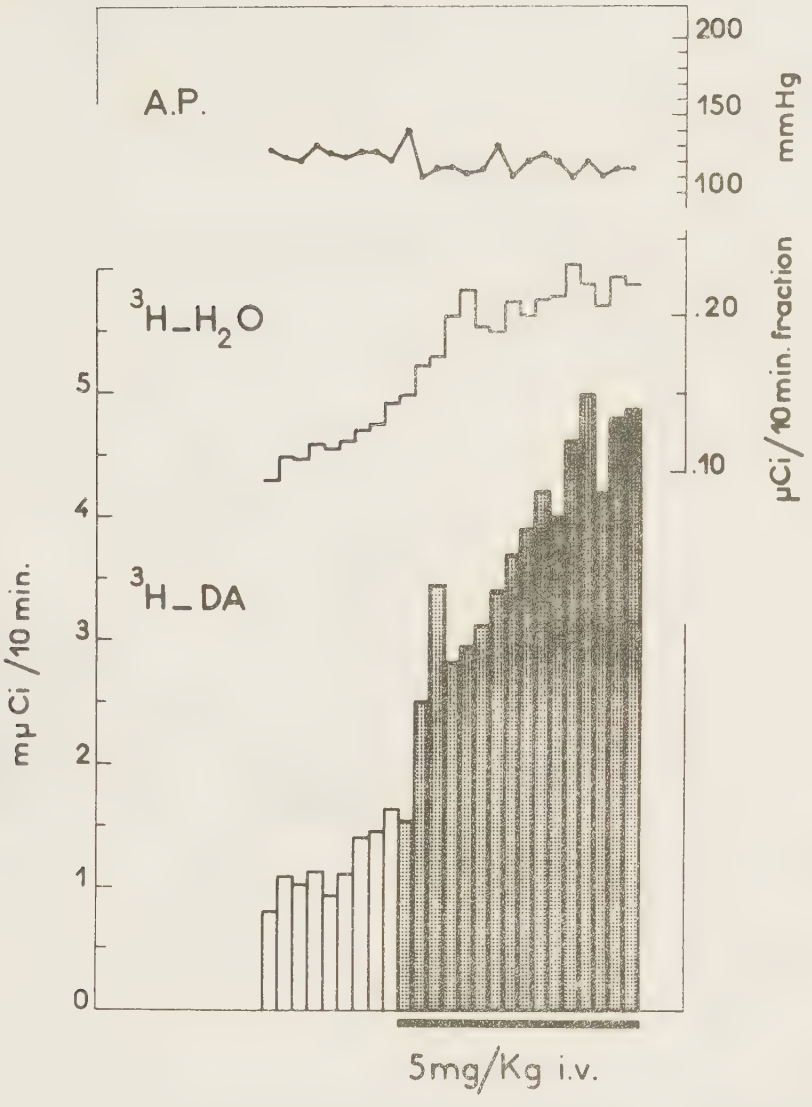


Fig.35 : Effet de l'injection intraveineuse de Thiopropérazine sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA.

La surface du noyau caudé est superfusée continuellement avec de la ^{3}H-tyrosine (40 µCi/ml). Deux heures après le début de la superfusion, la thiopropérazine (5 mg/kg) est injectée très lentement par voie intraveineuse. Les quantités de ^{3}H-DA et d'^{3}H-H_2O sont déterminées dans les fractions successives de superfusats (10 min.). Les modifications de la pression artérielle (P.A.) sont indiquées en haut de la figure.

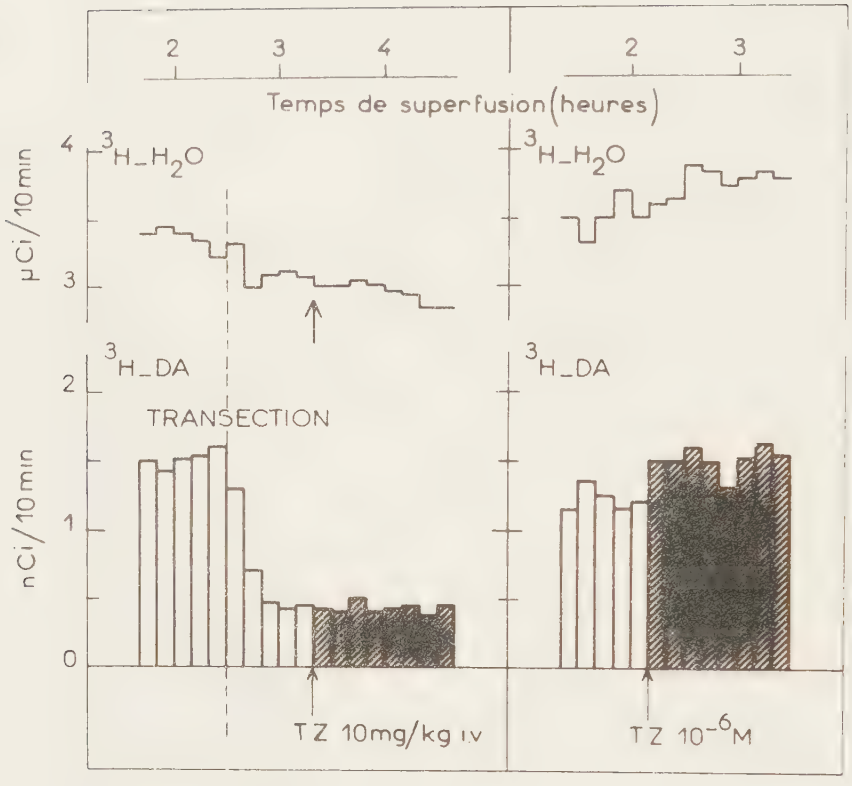


Fig.36 : Effets de la Thiopropérazine sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA.

La surface du noyau caudé est superfusée avec de la ^{3}H-tyrosine, et les quantités de ^{3}H-DA et l'^{3}H-H_2O sont déterminées dans les fractions collectées successivement toutes les 10 minutes.

Fig.36A : la thiopropérazine (5 mg/kg) est injectée par voie intraveineuse, 50 min. après avoir effectuée la section de la voie nigro-striatale avec une spatule métallique.

Fig.36B : 2 heures après le début de la superfusion avec de la ^{3}H-tyrosine, la thiopropérazine (TZ = 10^{-6}M) est ajoutée au liquide de superfusion.

C - Effet de l'inhibition des mécanismes d'inactivation de la DA.

Les principaux mécanismes d'inactivation de la DA sont d'une part une inactivation par recapture et d'autre part une inactivation enzymatique par désamination oxydative sous l'effet de la mono-amino-oxydase.

La benzotropine, en tant que puissant inhibiteur de la recapture de la DA (Coyle et Snyder, 1969 a), a été testée sur ce modèle. l'inhibiteur de la MAO choisi est la tranylcypromine, puisqu'il est particulièrement actif pour inhiber la dégradation de la DA au niveau du néostriatum (Youdim et coll., 1972).

1 - Effet d'un inhibiteur de la recapture : la benzotropine.

a - Protocole opératoire.

Lorsque la libération de la ^{3}H-DA a atteint un niveau stable, la benzotropine est ajoutée au liquide de superfusion (10^{-6}M) pendant 95 minutes. La concentration de 10^{-6}M a été choisie, puisque la capture de la DA est déjà inhibée de 50 % avec une concentration de benzotropine de 10^{-7}M (Coyle et Snyder, 1969 a).

La ^{3}H-DA et l'^{3}H-H_2O sont déterminées dans les fractions successives, avant, pendant et après l'application de benzotropine.

b - Résultats.

La drogue augmente graduellement la libération de la ^{3}H-DA en fonction du temps pendant les 40 premières minutes (fig. 37). Ensuite, la libération de la ^{3}H-DA se stabilise ; à ce moment, elle atteint un niveau 5 fois supérieur à celui obtenu sans inhibiteur de recapture. L'omission de la drogue du liquide de superfusion induit une diminution de la libération de l'amine. Cependant, la libération reste à un niveau plus élevé que le niveau initial obtenu avant le traitement.

L'effet de la benzotropine sur la libération de la ^{3}H-DA est associé à une augmentation de la formation de l'^{3}H-H_2O (table 25) qui indique une augmentation de la synthèse de la ^{3}H-DA (30 à 40 % pendant l'application de la drogue). Cet effet est encore visible après omission de la drogue du liquide de superfusion. La table résume les valeurs moyennes d'^{3}H-H_2O retrouvée dans les fractions successives collectées par période de 30 minutes.

c - Discussion.

Ces résultats démontrent l'importance des processus de recapture dans l'inactivation de la DA, puisque la libération sponta-

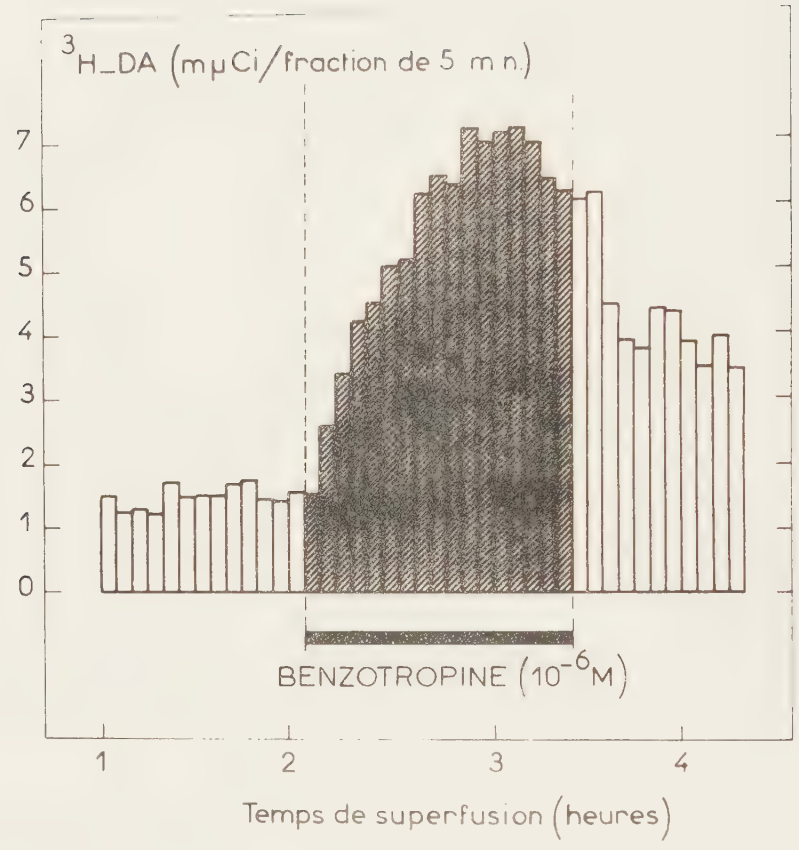


Fig.37 : Effet de l'application locale de benzotropine sur la libération de la ^{3}H-DA.

La surface du noyau caudé est superfusée en continu avec de la ^{3}H-tyrosine. Deux heures après le début de la superfusion, la benzotropine (10^{-6}M) est ajoutée dans le liquide physiologique pendant 85 minutes.

La ^{3}H-DA libérée, est mesurée dans les fractions collectées successivement toutes les 5 minutes.

TABLE 25

Mesure de l'$^{3}H-H_2O$ formée au cours de l'hydroxylation de la ^{3}H-tyrosine, avant, pendant et après l'application locale de benzotropine ($10^{-6}M$).

$^{3}H-H_2O$ (mμCi/fraction de 5 minutes)		
Avant Benzotropine	Pendant Benzotropine	Après Benzotropine
1 - 51,5 ± 2,9 2 - 50,4 ± 2,9	3 - 60,8 ± 2,6* (+19) 4 - 69,1 ± 1,9** (+35) 5 - 68,6 ± 2,5** (+34) 6 - 70,9 ± 4,6* (+39)	7 - 71,5 ± 1,7** (+40) 8 - 61,9 ± 2,0* (+21) 9 - 53,3 ± 0,5

* $p < 0,01$ ** $p < 0,001$ en comparant avec les quantités d'$^{3}H-H_2O$ contenues dans les superfusats avant l'addition de benzotropine.

Deux heures après le début de la superfusion du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine, la benzotropine ($10^{-6}M$) est ajoutée pendant 85 minutes au liquide de superfusion. L'$^{3}H-H_2O$ collectée dans les superfusats est mesurée dans des fractions successives de 5 minutes. La valeur moyenne ± l'erreur standard des quantités d'$^{3}H-H_2O$ trouvées pendant 9 périodes de 30 minutes (correspondant chacune à 6 fractions de 5 minutes) est donnée dans cette table. Les chiffres entre parenthèse représentent le pourcentage d'augmentation de la formation d'$^{3}H-H_2O$, après l'introduction de la benzotropine dans le liquide physiologique.

née de la DA peut être augmentée de 5 à 6 fois.

Les augmentations de libération de la ^{3}H-DA entraînent de nouveaux processus de régulation et notamment une augmentation de la synthèse de la ^{3}H-DA.

L'activité nerveuse semble nécessaire à l'effet activateur de la benzotropine sur la synthèse de la ^{3}H-DA. En effet, Javoy et coll., 1972, n'observent pas de modifications du taux de conversion de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA au niveau de coupes de striatum de rat incubées en présence de benzotropine. De fait, in vivo les quantités de ^{3}H-DA libérées et inactivées par les processus de recapture sont beaucoup plus importantes que dans un système in vitro. L'inhibition de la recapture de la DA peut provoquer une diminution de la DA au niveau du compartiment contrôlant la synthèse du médiateur, et ainsi activer la conversion de la tyrosine en DOPA par un mécanisme de rétroaction positif.

Il n'est cependant pas exclus que l'action de la benzotropine sur la synthèse de la DA soit également en relation avec ses effets sur d'autres systèmes de neurones impliqués dans le contrôle de l'activité des neurones dopaminergiques. En particulier, la benzotrotropine inhibe la synthèse de l'Ach sur une préparation synaptosomale obtenue à partir de striatum de rat (Guyenet et coll., 1973).

Il ne faut donc pas négliger une interaction possible entre les neurones cholinergiques et dopaminergiques dans les effets que nous avons observés au niveau du métabolisme de la DA.

2 - Effet d'un inhibiteur de la MAO : la tranylcypromine.

a - Protocole opératoire.

L'effet de la tranylcypromine sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA est testé d'une part pendant l'application locale de la drogue (10^{-5}M) et d'autre part après une injection intraveineuse.

b - Résultats. (fig. 38)

L'application locale de tranylcypromine induit une augmentation immédiate de la libération de la ^{3}H-DA (400 %). Après omission de la drogue la libération de la ^{3}H-DA est maintenue à un niveau plus élevé que le niveau précédent le traitement. De ce fait, l'effet immédiat induit par une seconde application de tranylcypromine est moins prononcé.

Simultanément, les quantités d'^{3}H-H_2O retrouvées dans les superfusats diminuent pendant l'application de la drogue.

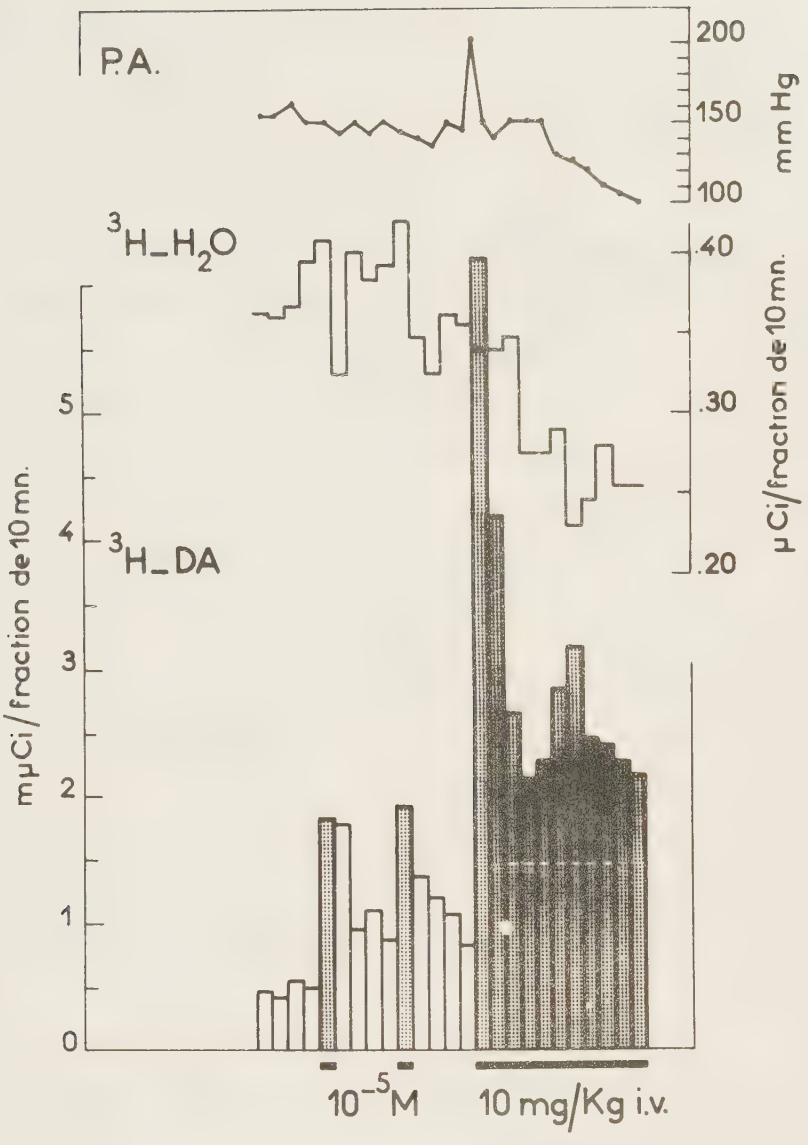


Fig.38 : Effet de la tranylcypromine sur la synthèse et la libération de la ^{3}H-DA.

Pendant la superfusion continue du noyau caudé avec de la ^{3}H-tyrosine, la tranylcypromine (10^{-5}M) est ajoutée au liquide physiologique ou injectée par voie intraveineuse (10 mg/kg).

Les quantités d'^{3}H-H_2O et de ^{3}H-DA contenues dans les fractions collectées successivement toutes les 10 minutes sont mesurées.

Lorsque l'IMAO est injecté par voie intraveineuse (10 mg/kg),l'augmentation de libération de la ^{3}H-DA est très importante pendant l'injection de la drogue, puis se stabilise à un niveau environ deux fois supérieur au niveau précédant le traitement. Par contre, la formation de l'^{3}H-H_2O diminue rapidement après l'administration de la drogue indiquant une inhibition de la synthèse de la ^{3}H-DA. La diminution de synthèse est de 30 % environ deux heures après l'injection.

c - Discussion.

Comme l'indiquent ces résultats, la dégradation de la DA par un inhibiteur de la MAO permet d'augmenter les concentrations extraneuronales de l'amine.

Les effets de la tranylcypromine apparaissent cependant assez complexes. Il est en effet possible de dissocier deux mécanismes d'action: un effet immédiat comparable à celui obtenu avec l'amphétamine, bien que d'intensité beaucoup plus faible, et un effet prolongé analogue à celui obtenu avec d'autres IMAO comme la pargyline (Besson et coll., 1972). L'analogie de structure de la tranylcypromine et de l'amphétamine permettent d'expliquer l'augmentation immédiate de libération induite par cette drogue. Par contre, l'effet prolongé de la tranylcypromine résulte vraisemblablement de l'inhibition irréversible de la MAO.

Ces résultats illustrent également l'inhibition de la synthèse de la DA provoquée par une augmentation des taux intraneuronaux de DA (Javoy et coll., 1972). L'inhibition de synthèse observée après une application locale de la drogue est vraisemblablement due à des mécanismes de régulation locaux intervenant au niveau de la synapse. On peut postuler que dans ce cas il existe une régulation par l'intermédiaire des récepteurs dopaminergiques préterminaux (Kehr et coll., 1972) stimulés par suite d'une augmentation de la concentration de la DA dans l'espace synaptique.

D - Conclusion.

L'^{3}H-H_2O trouvée dans les superfusats est formée spécifiquement au cours de la transformation de la ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA. En effet, l'inhibition de la synthèse de la ^{3}H-DA par l'αmpT entraîne une chute très nette des quantités d'^{3}H-H_2O retrouvées dans les superfusats.

L'estimation des quantités d'^{3}H-H_2O diffusant dans le liqui-

de de perfusion peut donc être utilisée comme un index de la vitesse de synthèse de la ^{3}H-DA.

Cette technique nous a permis de confirmer "in vivo" des résultats obtenus "in vitro".

En particulier, la stimulation et l'inhibition de la synthèse de la DA induite respectivement par la TZ (Besson et coll., 1971) et les inhibiteurs de la MAO (Javoy et coll., 1972) ont pu être mises directement en évidence au cours de ces expériences.

Par ailleurs, l'estimation en continu de la synthèse de la ^{3}H-DA "in vivo" réalisé en présence de benzotropine a révélé l'importance des processus de recapture ainsi que le rôle de la DA nouvellement captée dans le contrôle de la synthèse de l'amine.

Finalement les résultats obtenus semblent indiquer que la synthèse de la DA est partiellement dépendante de l'activité nerveuse, puisqu'une légère diminution de synthèse a pu être observée après section de la voie nigro-striatale.

C O N C L U S I O N

L'analyse des caractéristiques du métabolisme de la DA au niveau des terminaisons dopaminergiques de la voie nigro-striatale a pu être faite chez le rat et chez le chat par des approches complémentaires dans des situations "in vitro" et "in vivo". Schématiquement, deux groupes d'informations relatifs aux mécanismes de la synthèse et de la libération du médiateur ont pu être obtenus au cours de ce travail.

Un modèle expérimental nouveau permettant l'analyse de la régulation de la synthèse de la DA au niveau de son étape limitante a été mis au point. Il a tout d'abord été utilisé sur des coupes de tissus ou sur une préparation enzymatique, puis adapté à un modèle "in vivo". La complémentarité des résultats obtenus a permis de préciser la nature de certains mécanismes impliqués dans la régulation de la biosynthèse de l'amine.

Nous avons par ailleurs développé une méthodologie originale, qui permet d'apprécier la libération de la ^{3}H-DA nouvellement synthètisée au niveau du noyau caudé, chez le chat. De plus, l'analyse simultanée de la synthèse et de la libération de la ^{3}H-DA dans un modèle in vivo, a fourni les premiers indices des relations existant entre ces deux processus dans des conditions physiologiques.

Ces différents points seront successivement envisagés.

1 - Régulation de la synthèse de la DA.

La transformation de la tyrosine en DOPA : étape limitante de la biosynthèse de la DA, a été mesurée en déterminant l'^{3}H-H_2O formée pendant la réaction d'hydroxylation de la L-3-5 ^{3}H-tyrosine en ^{3}H-DOPA.

a - Cette technique offre certains avantages par rapport à la simple mesure de l'accumulation de la ^{3}H-DA dans les tissus. En effet, nous avons pu établir sans ambiguité qu'une drogue comme la réserpine qui augmente l'inactivation enzymatique de la DA en empêchant son stockage au niveau des vésicules synaptiques inhibe réellement la synthèse de cette amine.

De même, l'inhibition de synthèse induite par l'amphétamine a été clairement précisée. Dans ce cas également, la mesure de l'accumulation de la ^{3}H-DA dans les tissus ne permettait pas de définir nettement l'action de l'amphétamine : la diminution d'accumulation pouvant résulter d'une inhibition de synthèse ou d'une utilisation accrue

du médiateur consécutive à une augmentation de libération.

b - Cette technique nous a également permis de détecter in vitro des modifications métaboliques induites in vivo par certaines drogues psychotropes. Par exemple, l'altération du stockage de la DA induite par la réserpine est retrouvée in vitro ainsi que l'inhibition de synthèse qui en résulte. Cette technique a été utilisée par la suite dans d'autres études pour déterminer les modifications de synthèse induites par le traitement préalable des animaux avec des IMAO, la morphine ou d'autres drogues (Javoy et coll., 1972 ; Gauchy et coll., 1973). D'autre part, il est également intéressant de souligner que certains effets interneuronaux, qui ne peuvent donc être induits qu'in vivo, persistent in vitro même en l'absence des systèmes neuronaux impliqués dans cette régulation. Il apparaît en effet étonnant de pouvoir détecter in vitro l'activation de synthèse de la DA induite in vivo par la thiopropérazine. Cette observation initiale a permis d'analyser in vitro des modifications d'activité de certains systèmes neuronaux intervenant dans des situations physiologiques. Par exemple, les variations circadiennes de la synthèse de la DA ont pu être analysées in vitro (Javoy, 1972) en utilisant cette même approche de mesure de la synthèse.

c- La comparaison des taux de formation de l'^{3}H-H_2O, au niveau des coupes de striatum et d'une préparation enzymatique partiellement purifiée de tyrosine hydroxylase, a d'autre part permis de préciser certains mécanismes intervenant dans le contrôle de la synthèse de la DA. Après les différents traitements pharmacologiques examinés (amphétamine, réserpine, thiopropérazine), il ne nous a pas été possible de détecter un changement de l'activité de l'enzyme in vitro, en dépit des modifications de synthèse observées au niveau des coupes de striatum. Ces résultats ont été interprétés par l'existence d'un compartiment de DA cytoplasmique contrôlant la synthèse de l'amine par un mécanisme de rétroaction négative : les drogues examinées pouvant modifier localement les concentrations de DA au niveau des sites actifs de l'enzyme.

Il est également possible d'envisager un contrôle par des modifications de concentrations présynaptiques du médiateur (Kehr et coll., 1972) ou par d'autres mécanismes tels que des changements rapides des concentrations ioniques intraneuronales intervenant au cours de l'excitation par l'influx nerveux (Weiner et coll., 1973).

2 - Régulation de la libération de la DA.

La libération de la DA au niveau du noyau caudé avait été assez peu étudiée, vraisemblablement en raison des très faibles quantités de DA libérées échappant au processus d'inactivation.

a - La superfusion locale en continu des terminaisons dopaminergiques avec de la ^{3}H-tyrosine utilisée "in vivo" et mise au point grâce aux études préliminaires faites "in vitro" permet actuellement :

1- de mesurer la libération de la ^{3}H-DA et d'apprécier ses faibles variations intervenant pendant des périodes de temps courtes (5 à 10 minutes).

2 - d'analyser des fluctuations de libération de la ^{3}H-DA consécutives à des variations de synthèse. Ce qui ne peut être observé si les terminaisons dopaminergiques sont marquées préalablement avec de la ^{3}H-DA exogène.

b - La libération spontanée de la DA est dépendante d'une activation tonique des neurones dopaminergiques comme en témoignent les expériences de section de la voie nigro-striatale. La libération évoquée est difficile à réaliser par stimulation directe des corps cellulaires, mais semble par contre plus facile par stimulation des fibres. Ces études doivent être reprises en associant des expériences de refroidissement et d'applications locales de drogues au niveau de la substance noire. Néanmoins, la chute de la libération de la DA observée après section de la voie nigro-striatale, apporte un argument supplémentaire pour accorder à cette amine le rôle de médiateur dans la transmission de l'influx nerveux.

c - Le rôle fonctionnel de l'amine nouvellement synthétisée a pu être défini grâce à la confrontation des résultats obtenus "in vivo" et "in vitro". Parmi les résultats les plus marquants en faveur de cette hypothèse, nous retenons :

1 - Les courbes biphasiques de libération de la ^{3}H-DA obtenues "in vitro" et "in vivo" après un marquage préalable des terminaisons dopaminergiques avec de la ^{3}H-tyrosine.

2 - La diminution de la libération de la ^{3}H-DA synthétisée en continu à partir de ^{3}H-tyrosine observée après inhibition de la synthèse. Celle-ci souligne l'importance de l'amine néoformée dans les processus de libération spontanée ; la DA néoformée est vraisemblablement localisée au niveau des vésicules, puisque la réserpine qui s'oppose au stockage vésiculaire réduit la libération de l'amine.

d - La présence de deux formes de stockage et la participation de ces deux formes dans les processus de libération ont pu être mises en évidence par différents traitements pharmacologiques.

Des drogues comme l'amphétamine ou la phéniprazine augmentent principalement la libération de la DA néoformée. Par contre, la dépolarisation généralisée induite par les ions K^+ augmente la libération de la ^3H-DA provenant des deux formes de stockage.

e - Il est possible d'accroître les concentrations extraneuronales de DA en inhibant :

1 - la dégradation de la DA intracellulaire par un inhibiteur de la MAO ;

2 - la dégradation de la DA extracellulaire par un inhibiteur de la recapture comme la benzotropine. L'inhibition de l'inactivation de la DA par recapture semble le procédé le plus efficace pour augmenter les concentrations extraneuronales de DA. Ceci permet d'expliquer en partie les effets bénéfiques de cette drogue dans le traitement de la maladie de Parkinson.

f - L'adaptation à une étude in vivo de la mesure en continu de l'^3H-H_2O a permis d'établir des corrélations entre la synthèse et la libération de la DA.

1 - Ces premières études ont montré l'importance des mécanismes d'inactivation de la DA dans le contrôle de sa synthèse. La synthèse de la DA, qui est régulée par un mécanisme rétroactif, est inhibée après l'administration d'un IMAO par suite d'une augmentation des concentrations intraneuronales de l'amine.
Inversement, la synthèse est augmentée par la benzotropine, qui en s'opposant à la recapture de l'amine libérée, provoque une diminution des taux cytoplasmiques de la DA.

2 - L'activité nerveuse intervient également dans le contrôle de la synthèse de l'amine. La diminution de l'activité nerveuse obtenue après transection provoque une chute de la synthèse de la DA ; inversement, l'activation induite par la TZ augmente la synthèse. Cependant, les mécanismes de régulation sont induits très progressivement. Ceci suggère que dans notre préparation, la régulation de la synthèse est plus sous la dépendance des concentrations cytoplasmiques de la DA au niveau des sites actifs de l'enzyme, que tributaire de mécanismes de régulation liés aux changements des concentrations synaptiques du médiateur au niveau de récepteurs préterminaux dont l'existence est

encore hypothétique (Kehr et coll., 1972).

Les méthodologies et les concepts élaborés dans ce travail ont déjà eu certaines applications.

- Comme nous l'avons déjà mentionné, il a été possible de mesurer in vitro les modifications de synthèse et de libération au niveau des terminaisons dopaminergiques nigro-striatales, dans différentes conditions pharmacologiques ou physiologiques (Javoy et coll., 1972 ; Gauchy et coll., 1972).
- L'approche utilisée pour mesurer la libération de la ^{3}H-DA "in vivo" sur une préparation aigue, a déjà été adaptée à une préparation chronique chez le singe. Nous avons pu suivre dans ces conditions la libération de la ^{3}H-DA pendant plusieurs jours (Bioulac et coll., 1973). Il sera donc intéressant de comparer sur plusieurs espèces animales, l'influence de différentes structures du système extrapyramidal dans la régulation des neurones dopaminergiques nigro-strataux.
- L'étude de la libération d'autres médiateurs a également pu être réalisée en utilisant la technique de superfusion locale du noyau caudé. La libération de l'acétylcholine a été examinée chez le chat (Jones et coll., 1972). D'autre part, un travail réalisé en collaboration avec les Docteurs Snodgrass et Iversen a permis d'étudier chez le singe et le chat la libération de GABA.
- Finalement, le marquage continu des terminaisons catécholaminergiques avec de la ^{3}H-tyrosine a été adapté à la technique de "push-pull" canule. La libération de la ^{3}H-DA et de la ^{3}H-NA a ainsi pu être mise en évidence au niveau de l'hypothalamus postérieur (Philippu et coll., 1973).

Ce travail qui offre un certain nombre de développements présente cependant des nombreuses lacunes. Nous nous proposons d'analyser différents points, en particulier :

1) Le contrôle présynaptique de la libération de la DA. Ce contrôle peut être exercé par d'autres médiateurs chimiques. Notamment, des résultats préliminaires obtenus avec l'application locale d'Ach permet d'envisager un contrôle cholinergique à ce niveau. D'autre part, l'effet du GABA ou d'autres acides aminés inhibiteurs ou excitateurs devra être examiné.

Par ailleurs, il a été montré à la périphérie que des substances telles que les prostaglandines ou l'AMP cyclique peuvent réguler la libération des CA. Il semble donc intéressant d'analyser leurs effets sur la libération de la DA au niveau du noyau caudé.

2) Le contrôle de la libération de la DA par certains systèmes neuronaux, modulant l'activité des neurones dopaminergiques. En effet de très nombreuses terminaisons gabaminergiques ont été visualisées au niveau de la substance noire (Hattori et coll., 1973). La stimulation de ces neurones dépriment l'activité de nombreuses cellules de la substance noire (Precht et Yoshidat, 1971) et vraisemblablement celle des corps cellulaires dopaminergiques. La présence d'une voie striato-nigrale cholinergique a également été décrite (Olivier et coll., 1970). Le rôle de ces neurones sur le métabolisme de la DA striatale commence a être étudié (Javoy et coll., 1973).

3) Il est très vraisemblable également que les effets des drogues psychotropes étudiées varient en fonction du niveau d'activité des neurones dopaminergiques. Il paraît donc intéressant d'analyser les effets des drogues sur la libération et la synthèse de la ^{3}H-DA lorsque l'activité nerveuse est interrompue ou au contraire augmentée.

4) Enfin, les mécanismes rapides de régulation du métabolisme de la DA intervenant pendant la stimulation de la voie nigro-striatale doivent être analysés plus précisement et notamment les inter-relations existant entre la synthèse et la libération.

R E F E R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S -

ALBE-FESSARD, D., 1970, Tentative d'explication neurophysiologique de la pathologie du Parkinson. Dans Monoamines, Noyaux gris centraux et syndrome de Parkinson, Symposium Bel Air. IV - Cenève 1970, P. 243-262, Georg et Cie Genèvs, Publié sous la direction du Professeur J. de Ajuriaguerra.

ALBE-FESSARD, D., RAIEVA, S. and SANTIAGO, W., 1967, Sur les relations entre la substance noire et le noyau caudé. J. Physiol. Paris 59, 324.

ANDEN, N.E. and BEDARD, G., 1971, Influence of cholinergic mechanisms on the function and turnover of brain dopamine. J. Pharm. Pharmac. 23, 460-462.

ANDEN, N.E., BUTCHER, S.G., CORRODI, H., FUXE, K. and UNGERSTEDT, U., 1970 (a), Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics. European J. Pharmacol, 11, 303-314.

ANDEN, N.E., BUTCHER, S.G. and FUXE, K., 1970, Protection of the neostriatal dopamine stores against reserpine by local treatment with metatyramine. Acta Pharmacol, 28, 39-48.

ANDEN, N.E., CARLSSON, A., DAHLSTROM, A., FUXE, K., HILLARP, N.A. and LARSSON, K., 1964, Demonstration and mapping out of nigrostriatal dopamine neurons. Life Sci. 3, 523-530.

ANDEN, N.E., CORRODI, H., FUXE, K. and UNGERSTEDT, U., 1971, Importance of nervous impulse flow for the neuroleptic induced increase on amine turnover in central dopaminergic neurons. European J. Pharmacol. 15, 193-199.

ANDEN, N.E., DAHLSTROM, A., FUXE, K. and LARSSON, K., 1965, Further evidence for the presence of nigro-neostriatal dopamine neurons in the rat. Amer. J. Anat. 116, 329-333.

ANDEN, N.E., DAHLSTROM, A., FUXE, K. and LARSSON, K., 1966 (a), Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons.
Acta Pharmacol. (Kbh), 24, 263-274.

ANDEN, N.E., DAHLSTROM, A., FUXE, K., LARSSON, K., OLSON, L., and UNGERSTEDT, U., 1966 (b). Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon.
Acta Physiol. Scand. 67, 313-326.

ANDEN, N.E., FUXE, K., HAMBERGER, B. and HOKFELT, T., 1966 (c), A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neuron system in the rat.
Acta Physiol. Scand. 67, 306-312.

ANDEN,N.E., ROSS, B.E. and WERDINIUS, B., 1964 (a), Effects of chlorpromazine, haloperidol and reserpine on the levels of phenolic acids in rabbit corpus striatum.
Life Sci., 3, 149.

ANDEN, N.E., RUBENSON, A., FUXE, K. and HOKFELT, T., 1967, Evidence for dopamine receptor stimulation by apomorphine.
J. Pharm. Pharmacol, 19, 627-629.

ANTON, A.H. and SAYRE, D.F., 1962, A study of factors affecting the aluminium oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines.
J. Pharm. Exp. Ther., 138, 360.

ARNFRED, T. and RANDRUP, A., 1968, Cholinergic mechanism in brain inhibiting amphetamine induced stereotyped behavior.
Acta Pharmacol. Tox., 26, 384.

AXELROD, J., 1959, Metabolism of epinephrine and oter sympathomimetic amines.
Physiol. Rev., 39, 751-776.

AXELROD, J., ALBERS, W. and CLEMENTE, C.D., 1959, Distribution of ca-catechol-O-methyl transferase in the nervous system and other

tissues.
J. Neurochem., 5, 68-72.

BAGCHI, S.P. and Mac GEER, P.L., 1964, Some properties of tyrosine hydroxylase from th caudate nucleus.
Life Sci. 3, 1195-1200

BALDESSARINI, R.J. and KOPIN, I.J., 1966, Tritiated norepinephrine : Release from brain slices by electrical stimulation.
Science. N.Y. 152, 1630- 1631.

BALDESSARINI, R.J. and KOPIN, I.J., 1967, The effects of drugs on the release of norepinephrine H^3 from central nervous system tissue by electrical stimulation in vitro.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 156, 31-38.

BARBEAU, A., SOURKES, T.L., MURPHY, G.F., 1961, Les catecholamines dans la maladie de Parkinson dans Monoamines et système nerveux central.
Symposium Bel-Air. Genève 1961 p. 247-262 Georg et Cie. Genève. publié sous la direction du Professeur J. de Ajuriaguerra.

BAROLIN, G.S., BERNHEIMER, H. and HORNYKIEWICZ, O., 1964, Seitenverschiedenes Verhalten des Dopamins (3 hydroxytyramin) im Gehirn eines Falles von Hemiparkinsonismus.
Schweiz. Arch. Neurol. Psychiatr., 94, 241-248.

BARTHOLINI, G., BATES, M.M., BURKARD, W.P. and PLETSCHER, A., 1967, Increase of cerebral catecholamines caused by 3-4-dihydroxyphenylalanine after inhibition of peripheral decarboxylase.
Nature, 215, 852-853.

BARTHOLINI, G., BLUM, J.E. and PLETSCHER, A., 1969, Dopa induced locomotor stimulation after inhibition of extracerebral decarboxylase.
J. Pharm. Pharmacol, 21, 297-301.

BARTHOLINI, G., DA PRADA, M. and PLETSCHER, A., 1968, Decrease of ce-

rebral 5-hydroxytryptamine by 3-4 dihydroxyphenylalanine after inhibition of extracerebral decarboxylase.
J. Pharm. Pharmacol, 20, 228-229.

BARTHOLINI, G., PLETSCHER, A., 1968, Cerebral accumulation and metabolism of ^{14}C-DOPA after selective inhibition of peripheral decarboxylase.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 161, 14-20.

BEDARD, P., LAROCHELLE, L., PARENT, A., et POIRIER, L.J., 1969, The nigro-striatal pathway : a correlative study based on neurochemical criteria in the cat and the monkey.
Experimental Neurol., 25, 365-377.

BEDARD, P., LAROCHELLE, L., POIRIER, L.J. and GOURDES, T.L., 1970, Reversible effect of L-DOPA on tremor and catotonia induced by α-methyl-para-tyrosine.
Can J. Physiol. Pharmacol., 48, 82-84.

BEIN, J.H., 1953, Zur Pharmakilogie des Reserpin, eines neuen Alkaloïds aus Rauwolfia serpentina Benth.
Experientia, 9, 107-110

BEIN, J.H., 1956, Pharmacology of rau wolfia.
Pharmacological Rev, 8, 435-483.

BERNHEIMER, H. and HORNYKIEWICZ, O., 1965 (a), Wirkung von Phenothiazin - derivaten auf den Dopamin (3 Hydroxytyramin) Stoffwechsel ins Nucleus caudatus.
Arch. Exp. Path. Pharmak., 251, 135-136.

BERNHEIMER, H., HORNYKIEWICZ, O., 1965 (b), Herabgesetzte Konzentration der Homovanillinsaüse im Gehirn von parkinson Kranken Menschen als Ausdruck der Störung des zentralen Dopaminstoffwechsels.
Klin. Wschr, 43, 711-715.

BERNHEIMER, H., BIRKMAYER, W., HORNYKIEWICZ, O., 1963, Zur Biochemie des Parkinson-Syndroms des Menschen. Einfluss der Monoamino-

oxydase. Hemmer Therapie auf die Konzentration des Dopamins, Noradrenalins und 5 Hydroxytrypamins im Gehirn.
Klin. Wschr. 41, 465-469.

BERTLER, A. and ROSENGREN, E., 1959, Occurence and distribution of dopamine in brain and other tissues.
Experientia, 15, 10-11.

BESSON, M.J., CHERAMY, A., FELTZ, P. and J. GLOWINSKI, 1969, Release of newly synthetized dopamine from dopamine-containing terminals in the striatum of the rat.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 62, 741-748.

BESSON, M.J., CHERAMY, A., FELTZ, P. and GLOWINSKI, J., 1971 (a), Dopamine : spontaneous and drug induced release from the caudate nucleus in the cat.
Brain Res., 32, 407-424.

BESSON, M.J., CHERAMY, A., GAUCHY, C. and GLOWINSKI, J., 1972, Effects of MAO inhibitors on the in vivo release of dopamine from the cat caudate nucleus.
Vth Congress on Pharmacology. San Francisco. n° 119.

BESSON, M.J., CHERAMY, A. and GLOWINSKI, J., 1971 (b), Effects of some psychotropic drugs on dopamine synthesis in the rat striatum.
J. Pharmacol. Exp . Therap., 177, 196-205.

BIOULAC, B., GAUCHY, C., CHERAMY, A., BESSON, M.J., GLOWINSKI, J. and VINCENT, D., 1973. Chronic estimation of DA release from the caudate nucleus of the macaca mulatta. Fed. Prog. (USA), 32, n° 3372

BIRKMAYER, W. and HORNYKIEWICZ, O., 1961, Der L-Dioxyphenylalanin (L-DOPA) - Effekt bei der Parkinson - Akinese.
Wien Klin. Wschr., 73, P 787-788.

BLASHKO, H., 1954, Amine oxidase and amine metabolism.
Pharmacol. Rev., 6, 23-28.

BLASCHKO, H. and CHRUSCIEL, T.L., 1960, The decarboxylation of amino-acids related to tyrosine and their awakening action in reserpine treated mice.
J. Physiol., 151, 272-284.

BLOOM, F.E., COSTA, E. and SALMOIRAGHI, G.C., 1965, Anaesthesia and the responsiveness of individual neurons of the caudate nucleus of the cat to acetylcholine , norepinephrine and dopamine administered by microelectrophoresis.
J. Pharmac. Exptl. Ther., 150, 244-252.

BRADLEY, P.B., WOLSTENCROFT, J.H., HOSLI, L. and AVANZINO, G.L. ,1966, Neuronal basis for the central action of chlorpromazine.
Nature, 212, 1425-1427.

BRODIE, B.B., SPECTOR, S. and SHORE, P.A., 1959, Interaction of monoamine oxydase inhibitor with physiological and biochemical mechanism in brain. Annals N.Y. Acad. Science, 80, 609-616.

BURNARD, W.P., GEY, K.F. and PLETSCHER, A., 1967, Activation of tyrosine hydroxylation in rat brain in vivo by chlorpromazine.
Nature, 213, 732.

BUSTON, G. and ROTH, R.H., 1972, Release of monoamines from the striatum and hypothalamus : effect of gamma-hydroxybutyrate.
British J. Pharmacol., 46, 101-115.

BUTCHER, L.L. and ENGEL, J., 1969, Behavioural and biochemical effects of L-DOPA after peripheral decarboxylase inhibition.
Brain Res., 15, 233-242.

BUTCHER, L., ENGEL, J. and FUXE, K., 1970, L-DOPA induced changes in central monoamine neurons after peripheral decarboxylase inhibition.
J. Pharm. Pharmacol. 22, 312-315.

CALAS, A., PEYSON, M.J., CHERAMY, A., GAUCHY, C., and GLOWINSKI, J., 1973, Electron microscopic autoradiographic studies of the 5 HT containing terminals in the cat caudate nucleus (à paraître).

CARLSSON, A., 1959, Occurence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system.
Pharmacol. Rev. 11, 490-493.

CARLSSON, A., 1966, Drugs which block the storage of 5-hydroxytryptamine and related amines.
Handb. exp. Pharmak, 19, 529-592.

CARLSSON, A., DAHLSTROM, A., FUXE, K., LINDQVIST, M. and MASUOKA, D., 1965, Effects of the amphetamine group on the intraneuronal brain amines in vivo and in vitro.
J. Pharmac. Pharmacol. 17, 521

CARLSSON, A., FUXE, K., HAMBERGER, B. and LINDQVIST, M., 1966 (a), The effect of (+) amphetamine on various central and peripheral catecholamine containing neurons.
J. Pharmac. Pharmacol. 18, 128.

CARLSSON, A., FUXE, K., HAMBERGER, B. and LINDQVIST, M., 1966 (b),Biochemical and histochemical studies on the effects of imipramine like drugs and (+) amphetamine on central and peripheral catecholamine neurons.
Acta Physiologica Scand. 67, 481- 497

CARLSSON, A., HILLARP, N.A. and WALDECK, B., 1963, Analysis of the Mg^{++}-ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla.
Acta Physiol. Scand. 59, Suppl. 215-1-38.

CARLSSON, A., and LINDQVIST, M., 1963, Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain.
Acta pharmacol. toxicol., 20, 140.

CARLSSON, A., and LINDQVIST, M., 1967, Metatyrosine as a tool for selective protection of catecholamine stores against reserpine.
Europ. J. Pharmacol., 2, 187-192.

CARLSSON, A., LINDQVIST, M., and MAGNUSSON, T;, 1957, 3-4- dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists.
Nature, 180, 1200.

CARLSSON, A., LINDQVIST, M., MAGNUSSON, T. and WALDECK, B., 1958, On the presence of 3-hydroxytyramine in brain.
Science, 127, p. 471

CRAIG, T.N. and POPIN, J.J., 1968, Stimulus induced release of substances from olfactory bulb using the push-pull cannula.
Nature, 217, 466-467.

CHERAMY, A., BESSON, M.J. and GLOWINSKI, J., 1970, Increased release of dopamine from striatal dopaminergic terminals in the rat after treatment with a neuroleptic : thioproperazine.
European J. Pharmacol. 10, 206-214.

[illegible], C.C. and MOORE, K.E., 1973, Release of endogenously synthetized catechols from the caudate nucleus by stimulation of the nigro-striatal pathway and by administration of d-amphetamine.
Brain Res., 50, 221-225.

COLLINS, R.F., 1954, Localisation of an experimental hypothalamic and midbrain syndrome simulating sleep.
J. Comp. Neurol., 100, 661-690.

CONNOR, J.D., 1968, Caudate unit responses to nigral stimuli : evidence for a possible nigro-neostriatal pathway.
Science, 160, 800-000.

[illegible], E.T., 1970, Caudate nucleus neurons : correlation of the effects of substantia nigra stimulation with iontophoretic dopamine.
J. Physiol. (London) 208, 691-703.

[illegible], E.T., 1971, Comparison of the effects of electrical stimulation and iontophoretic dopamine on neurons of the nigro-

neostriatal pathway.
Dans "Brain chemistry and Mental Disease". Ed. par Beng T. Ho et W.M. Mc Isaac. Plenum Publishing corporation. p.113-122

CONSOLO, S., DOLFINI, E., GARATTINI, S. and VALZELLI, L., 1967, Desipramine and amphetamine metabolism.
J. Pharm. Pharmacol. 19, 253-256.

CONSTANTINIDIS, J., DE LA TORRE, J.C., TISSOT, R., et GEISSBUHLER, F., 1969, la barrière capillaire pour la DOPA dans le cerveau et les différents organes.
Psychopharmacologia, (Berl), 15, 75-87.

CORRODI, H.K., FUXE, K. and HOKFELT, T., 1967, The effect of neuroleptics on the activity of central catecholamine neurons.
Life Science, 6, 767-774

CORRODI, H., FUXE, K. and HOKFELT, T., 1967 (a), The effect of some psychoactive drugs on central monoamine neurons.
European J. Pharmacol., 1, 363-368

CORRODI, H., FUXE, K., LINDBRICK, P., 1972, Interaction between cholinergic and catecholaminergic neurons in rat brain.
Brain Res, 43,397-416.

CORRODI, H. and HANSON, L.C.F., 1966, Central effects of an inhibitor of tyrosine hydroxylation.
Psychopharmacologia (Berl) 10, 116-125.

COSTA, E., GESSA, G.L., KUNTZMAN, R. and BRODIE, B.B., 1962, A differential action of reserpine on brain dopamine stores in rabbit.
Life Sci. 11, 599-604.

COSTA, E. and NEFF, N.H., 1966, Isotopic and non isotopic measurements of catecholamine biosynthesis.
In "Biochemistry and Pharmacology of the basal ganglia". Ed. by E.Costa, L.Cole and M.D.Yahn. p 141-156. Raven Press. New-York.

COTZIAS, G.C., PAPAVASILIOU, P.S. and GELLENE, R., 1969, Modification of parkinsonism. Chronic treatment with L-DOPA.
New Engl. J. Med., 280, 337-345.

COTZIAS, G.C., Van WOERT M.H. and SCHIFFER, L.M., 1967, Aromatic amino acids and modification of parkinsonism.
New Engl. J. Med., 276, 374-379.

COYLE, J.T. and SNYDER, S.H., 1969 (a), Antiparkinsonian drugs : inhibition of dopamine uptake in the corpus striatum as a possible mechanism of action.
Science, 166, 899-901.

COYLE, J.T. and SNYDER, S.M., 1969 (b), Catecholamine uptake by synaptosomes in homogenates of rat brain : stereospecificity in different areas.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 170, 221-231.

CREESE, I. and IVERSEN, S.D., 1972, Amphetamine response in rat after dopamine neuron destruction.
Nature New Biol., 238, 247-248.

DAHLSTRÖM, A. and FUXE, K., 1964, Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I - Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons.
Acta Physiol. Scand., 62, suppl. 232, 1- 55.

DAHLSTRÖM, A. and FUXE, K., 1965, Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. II - Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems.
Acta Physiol. Scand., 64, suppl. 247, 1-36.

DAHLSTRÖM, A., FUXE, K., HAMBERGER and HÖKFELT, T., 1967, Uptake and storage of catecholamines in rabbit brain after chronic reserpine treatment.
J. Pharm. Pharmac., 19, 345-349.

DAHLSTRÖM, A., FUXE, K. and HILLARP, N.A., 1965, Site of action of reserpine.
Acta Pharmacol. Tox., 22, 277-292.

DAHLSTRÖM, A. and HAGGENDAL, J., 1970, Axonal transport of amine storage granules in sympathetic adrenergic neurons.
Advances in Biochemical Psychopharmacology. 2, 65-93.

DA PRADA, M. and PLETSCHER, A., 1966, Acceleration of cerebral dopamine turnover by chlorpromazine.
Experientia, 22, 465.

DELAY, J. et DENIKER, P., 1961, Apport de la clinique à la connaissance de l'action des neuroleptiques. Dans : Revue Canadienne de Biologie. "Système extrapyramidal et neuroleptique". (Bordeleau ed., Montréal, 301-327).

DEL RIO, J. and FUENTES, J.A., 1969, Further studies on the antagonism of stereotyped behaviour induced by amphetamine.
European J. Pharmacol., 8, 73-78.

DENGLER, H.J., MICHAELSON, I.A., SPIEGEL, H.E. and TITUS, E., 1962, The uptake of labelled norepinephrine by isolated brain and other tissues of the cat.
Int. J. Neuropharmacol. 1, 23-38.

DOMINIC, J.A. and MOORE, K.E., 1969, Acute effects of α-methyl tyrosine on brain catecholamine levels and on spontaneous and amphetamine stimulated motor activity in mice.
Arch. Int. Pharmacodyn, 178, 166.

DUNCAN, R.J.S., SOURKES, T.L., BOUCHER, R., POIRIER, L.J., ROBERGE, A., 1972, Aldehyde deshydrogenase and monoamine oxidase in the striatum of cats with nigro-striatal lesions.
J. Neurochem., 19, 2007-2010.

EHRINGER, H. and HORNYKIEWICZ, O., 1960, Verteilung von Noradrenalin

und Dopamin (3-hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. Klin. Wschr, 38, 1236-1239.

ERNST, A.M., 1965, Relation between the action of dopamine and apomorphine and their O-methylated derivatives upon the CNS. Psychopharmacologia, 7, 391-399.

ERNST, A.M., 1967, Mode of action of apomorphine and dexamphetamine on gnawing compulsion in rats. Psychopharmacologia (Berl), 10, 316-323.

ERNST, A.M., 1969, The role of biogenic amines in the extrapyramidal system. Acta Physiol. Pharmacol. Neurol., 15, 141-154.

EVERETT, G.M. and BORCHERDING, J.W., 1970, L-DOPA : effect on concentrations of dopamine,norepinephrine and serotonin in brains of mice. Science, 168, 849-850.

FALCK, B., HILLARP, N.A., THIEME, G., TORP, A., 1962, Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem., 10, 348-354.

FARNEBO, L.O. and HAMBERGER, B., 1971, Drug - induced changes in the release of ^{3}H-monoamine from field stimulated rat brain slices. Acta Physiol. Scand., suppl. 371, 35-44.

FELTZ, P. and ALBE-FESSARD, D., 1972, A study of an ascending nigrocaudate pathway. Electroenceph. clin. Neurophysiol., 33, 179-193.

FELTZ, P. and DE CHAMPLAIN, J., 1972, Persistence of caudate unitary responses to nigral stimulation after destruction and functional impairment of the striatal dopaminergic terminals.

Brain Res., 43, 595-600.

FELTZ, P. and Mac KENZIE, J.S., 1969, Properties of caudate unitary responses to repetitive nigral stimulation.
Brain Res., 13, 612-616.

FIBIGER, H.C., PUDRITZ, R.E., Mac GEER, P.L. and Mac GEER, E.G., 1972, Axonal transport in nigro-striatal and nigro thalamic neurons : effects of medial forebrain bundle lesions and 6 OH-DA.
J. Neurochem., 19, 1697-1708.

FRIGYESI, T.L. and PURPURA, D.P., 1967, Electrophysiological analysis of reciprocal caudate-nigral relations.
Brain Res., 6, 440-456.

FUXE, K., 1965 (a), Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system.
Acta Physiol. Scand., 64, suppl. 247, 36-85.

FUXE, K., 1965 (b), Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. III. Presence of monoamine containing nerve terminals in the lower brain stem.
Z. Zellforsch., 65, 573-596.

FUXE, K. and ANDEN, N.E., 1966, Studies on central monoamine neurons with special reference to the nigro-neostriatal dopamine neuron system.
In "Biochemistry and Pharmacology of the Basal ganglia" Eds : E.Costa, L.J. Coté and M.D. Yahr. Raven Press. Hewlett. N.Y pp. 123-129.

FUXE, K., HÖKFELT, T. and NILSSON, O., 1964, Observations on the cellular localisation of dopamine in the caudate nucleus of the rat.
Z. Zellforsch., 63, 701-706.

FUXE, K., HÖKFELT, T. and UNGERSTEDT, U., 1969, Distribution of mono-

amines in the mammalian central nervous system by histochemical studies.
Dans "Metabolism of Amines in the brain". Ed. by HOOPER, G. pp. 10-32. Mac millan.

FUXE, K. and UNGERSTEDT, U., 1968, Histochemical studies on the effect of (+) amphetamine drugs of the imipramine group and tryptamine neurons after intraventricular injection of catecholamines and 5 hydroxytryptamine.
European J. Pharmacol. 4, 135-144.

FUXE, K. and UNGERSTEDT, U., 1970, Histochemical, biochemical and functional studies on central monoamine neurons after acute and chronic amphetamine admistration.
In International symposium on Amphetamine and related compounds. Ed. by Costa, E. and Garattini, S. Raven Press. N.Y p. 257-288.

FYRO, B., NYBACK, H. and SEDVALL, G., 1972, Tyrosine hydroxylation in the rat striatum in vitro and in vivo after nigral lesion and chlorpromazine treatment.
Neuropharmac., 11, 531-537.

GAUCHY, C., AGID, Y., GLOWINSKI, J. and CHERAMY, A., 1973, Acute effects of morphine on dopamine synthesis and release and tyrosine metabolism in the rat striatum.
European J. Pharmacol. 22, 311-319.

GLOWINSKI, J., 1967, Métabolisme des catécholamines dans le cerveau du rat.
Thèse Doctorat d'Etat. Paris.

GLOWINSKI, J. and AXELROD, J., 1965, Effects of drugs on the uptake release and metabolism of ^{3}H-norepinephrine in the rat brain.
J. Pharmacol. 149, 43-49.

GLOWINSKI, J., AXELROD, J. and IVERSEN, L., 1966(a), Regional studies of catecholamines in the rat brain. IV. Effects of drugs on

the disposition and metabolism of ^{3}H-norepinephrine and ^{3}H-Dopamine.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 153, 30-41.

GLOWINSKI, J. and IVERSEN, L.L., 1966 (a), Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. Disposition of ^{3}H-norepinephrine, ^{3}H-Dopamine and ^{3}H-DOPA in various regions of the brain.
J. Neurochem., 13, 655-669.

GLOWINSKI, J. and IVERSEN, L.L., 1966 (b), Regional studies of catecholamines in the rat brain. III. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions.
Biochem. Pharmacol., 15, 977-987.

GLOWINSKI, J., IVERSEN, L.L. and AXELROD, J., 1966 (b), Storage and synthesis of norepinephrine in the reserpine treated rat brain.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 151, 385-399.

GLOWINSKI, J., KOPIN, I.J. and AXELROD, J., 1965, Metabolism of ^{3}H-norepinephrine in the rat brain.
J. Neurochem, 12, 25-30.

GLOWINSKI, J., SNYDER, S.H. and AXELROD, J., 1966 (c), Subcellular localisation of ^{3}H-norepinephrine in the rat brain, and the effect of drugs.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 152, 282-292.

GOLDSTEIN, M., ANAGNOSTE, B., BATTISTA, A.F., OWEN, W.S. and NAKATANI, S., 1969, Studies of amines in the striatum in monkeys with nigral lesions.
The disposition, biosynthesis and metabolites of ^{3}H-Dopamine and ^{14}C serotonin in the striatum.
J. Neurochem., 16, 645-653.

GOLDSTEIN, M., ANAGNOSTE, B., OWEN, W.S. and BATTISTA, A.F., 1966, the

effects of ventromedial tegmental lesions on the biosynthesis of catecholamines in the striatum.
Life Sciences, 5, 2171-2176.

GOLDSTEIN, M., ANAGNOSTE, B., OWEN, W.S., BATTISTA, A.F., 1967, The effects of ventromedial tegmental lesions on the disposition of dopamine in the caudate nucleus of the monkey.
Brain Res., 4, 298-300.

GUYENET, P., LEFRESNE, P., BEAUJOUAN, J.C., ROSSIER, J. et GLOWINSKI, J., 1973, Inhibition par certains antiparkinsoniens de la synthèse d'acétylcholine et de la capture de choline au niveau des synaptosomes de striatum chez le rat.
Association Française des Pharmacologistes. IX^{ème} Réunion. Paris.

HÄGGENDAL, J. and DAHLSTRÖM, A., 1971, The recovery of noradrenaline in adrenergic nerve terminals of the rat after reserpine treatment.
J. Pharm. Pharmac., 28, 81-89.

HÄGGENDAL, J. and LINDQVIST, M., 1963, Behaviour and monoamine levels during long term administration of reserpine to rabbits.
Acta Physiol. Scand., 57, 431-436.

HÄGGENDAL, J. and LINDQVIST, M., 1964, Disclosure of labile monoamine fractions in brain and their correlation to behaviour.
Acta Physiol. Scand., 60, 351-357.

HAMBERGER, B., 1967, Reserpine resistant uptake of catecholamines in isolated tissues of the rat.
Acta Physiol. Scand., suppl. 295, 1-56.

HANSSON, L.C.F., 1967, Evidence that the central action of d-amphetamine is mediated via catecholamines.
Psychopharmacologia (Berlin), 10, 289.

HASSLER, R., 1938, Zur Pathologie der Paralysis agitans und des post

encephalitischen Parkinsonismus.
J. Psychol. Neurol. (Lpz), 48, 387-476.

HASSLER, R., 1955, The pathological and pathophysiological basis of tremor and parkinsonism.
Proc. 2nd. Int. Congr. Neuropathol. London. 1, p. 29-58.

HATTORI, T., Mac GEER, P.L., FIBIGER, H.C. and Mac GEER, E.G., 1973, On the source of GABA containing terminals in the substantia nigra. Electron microscopic autoradiographic and biochemicals studies.
Brain Res., 54, 103-114.

HELLER, A., HARVEY, J.A. and MOORE, Y., 1962, A demonstration of a fall in brain serotonin following central nervous system lesions in the rat.
Biochem. Pharmacol. 11, 859-866.

HERMAN, Z.S., 1967, Influence of some psychotropic and adrenergic blocking agents upon amphetamine stereotyped behavior in white rats.
Psychopharmacologia, 11, 136.

HERZ, A. and ZIEGLGÄNGSBERGER, W., 1966, Synaptic excitation in the corpus striatum inhibited by microelectrophoretically administered dopamine.
Experientia, 22, 839-842.

HÖKFELT, T., 1968, In vitro studies on central and peripheral monoamine neurons at the ultrastructural level.
Z. Zellforsch, 91, 1-74.

HÖKFELT, T. and UNGERSTEST, U., 1969, Electron and fluorescence microscopical studies on the ascending nigro-neostriatal dopamine neurons.
Acta Physiol. Scand., 76, 415-426.

HOLZBAUER, M. and VOGT, M., 1956, Depression by reserpine of the nora-

drenaline concentration in the hypothalamus of the cat. J. Neurochem., 1, 8-11.

MORITA, A., 1959, Pharmacology of J B 516 (β-phenylisopropylhydrazine) p. 590-595. Annals of the New York academy of Sciences. Amine oxidase inhibitors. Vol. 80. Art. 3.

HORNYKIEWICZ, O., 1963, Die topische Lokalisation und das Verhalten von Noradrenalin und Dopamin (3-hydroxy-tyramin) in der Substantia Nigra des normalen und Parkinsonkranken Menschen. Wien. Klin. Wschr., 75, 309-312.

HORNYKIEWICZ, O., 1964, The role of dopamine (3-hydroxytyramine) in parkinsonism.
In : Biochemical and Neurophysiological Correlations of centrally acting drugs. Ed. by Trabucchi, E., Paoletti, R. and Canal, N. Pergamon Press. Oxford - London - Edinburgh - New York - Paris - Frankfort - p. 143 - 157.

HORNYKIEWICZ, O., 1966, Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function.
Pharmacol. Rev., 18, 925-964.

HORNYKIEWICZ, O., 1970, Histochemistry, Biochemistry and Pharmacology of brain catecholamines in Extrapyramidal Syndromes in man.
In : "Monoamines, noyaux gris centraux et syndrome de Parkinson". Symp. Bel Air IV. Genève. Prof. J. Ajuriaguerra. Eds. Georg et C^{ie}, Genève. Masson et C^{ie}, Paris. p. 143-157.

HULL, C.D., BERNARDI, G. and BUCHWALD, N.A., 1970, Intracellular responses of caudate neurons to brain stem stimulation.
Brain Res., 22, 163-179.

IVERSEN, S.D., 1971, The effect of surgical lesions to frontal cortex and substantia nigra on amphetamine response in rats.
Brain Res., 31, 295-311.

IVERSEN, L.L. and GLOWINSKI, J., 1966, Regional studies of catechola-

mines in the rat brain. II. Rate of turnover of catecholamines in various brain regions.
J. Neurochem., 13. 671-682.

IKEDA, M., FAHIEN, L.A. and UDENFRIEND, S., 1966, A kinetic study of bovine adrenal tyrosine hydroxylase.
J. Bio. chem., 241, 4452-4456.

JAVOY, F., 1972, métabolisme de la dopamine dans les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striatale chez le rat.
Thèse doctorat d'Etat. Université Paris VI.

JAVOY, F., AGID, Y., BOUVET, D., GLOWINSKI, J., 1972, Regulation of DA synthesis in dopaminergic terminals of the CNS by a negative feedback mechanism.
J. Pharm.and Exp. Ther., 182, 454-463.

JAVOY, F., AGID, Y., GLOWINSKI, J. and SOTELO, C., 1973, Biochemical and morphological changes after mechanical or chemical degeneration of the dopaminergic nigro-neostriatal pathway.
Symposium on "Dynamics of degeneration and growth in neurons". Stockholm. 16-18 mai.

JAVOY, F., AGID, Y. et GLOWINSKI, J., 1973, Changes in striatal DA metabolism induce by cholinergic and anticholinergic nigral stimulation in the rat.
III. Int. CA symposium, Frontiers in CA research. Strasbourg. 20-25 Mai 73. Pergamon Press.

JAVOY, F. and GLOWINSKI, J., 1971, Dynamic characteristics of the "functional compartment" of dopamine in dopaminergic terminals of the rat striatum.
J. Neurochem., 18, 1305-1311.

JAVOY, F., HAMON, M. and GLOWINSKI, J., 1970, Disposition of newly synthesized biogenic amines in cell bodies and terminals of central aminergic neurons. I. Effect of amphetamine and thioproperazine on the metabolism of catecholamines in the cau-

date nucleus, the substantia nigra and the ventromedial nucleus of the hypothalamus.
European J. Pharmacol., 10, 178-188.

JONES, B., 1970, The double role of catecholamines in waking and paradoxical sleep : A neuropharmacological model.
PHD Thesis. University of Delaware.

JONES, B., JOUVET, M., 1969, Effets de la destruction des neurones contenant des catécholamines du mésencéphale sur le cycle veille-sommeil du chat.
Comptes Rendus des séances de la Soc. Biol. (Paris), 163, 178-180.

JONES, B.E., GUYENET, P., CHERAMY, A., GAUCHY, C. and GLOWINSKI, J., 1973, The in vivo release of acetylcholine from cat caudate nucleus after pharmacological and surgical manipulations of dopaminergic nigro-striatal neurons.
Sous presse à Brain Research.

JUNG, R. and HASSLER, R., 1960, The extrapyramidal motor system.
In "Handbook of Physiology". Vol II. pp 863-927.

JULOU, L., BARDONE, R., DUCROT, B., LAFFARGUE, B. and LOTTEAU, J., 1969, Comparaison des effets des neuroleptiques dans divers tests en administration unique et en administrations répétées. Hypothèses sur la signification des tests utilisés et leur valeur prévisionelle.
Excerpta Medica Intern. Congrès, Séries n 199, Proceedings of the V^th International Congress of the collegium internationale neuropsychopharmacologicum, p. 203.

KEHR, W., CARLSSON, A., LINDQVIST, M., MAGNUSSON, T. and ATACK, C., 1972, Evidence for a receptor-mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity.
J. Pharm. Pharmacol., 24, 744-747.

KIM, J.S., BAK, I.J., HASSLER, R. and OKADA, Y., 1971, Role of γ-amino-

butyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. II. Some evidence for the existence of a type of GABA rich strionigral neurons.
Exp. Brain Res., 14, 95-104.

KOPIN, I.J., BREESE, G.R., KRAUSS, K.R. and WEISE, V.K., 1968, Selective release of newly synthetized norepinephrine from the cat spleen during sympathetic nerve stimulation.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 161, 271-278

KOPIN, I.J., WEISE, V.K. and SEDVALL, G.C., 1969, Effect of false transmitters on norepinephrine synthesis.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 170, 246-252.

LADURON, P. and BELPAIRE, F., 1968, Tissue fractionation and catecholamines.
Biochem. Pharmacol., 17, 1127-1140

LAROCHELLE, L., BEDARD, P., POIRIER, L.J. and SOURKES, T.L., 1970, The rubro-olivo-cerebello-rubral loop and postural tremor in the monkey.
J. Neurol. Sci., 11, 53-64.

LAROCHELLE, L., BEDARD, P., POIRIER, L.J. and SOURKES, T.L., 1971, Correlative neuroanatomical and neuropharmacological study of tremor and catatonia in the monkey.
Neuropharmacol.,10, 273-288.

LAURSEN, A.M., 1963, Corpus striatum.
Acta Physiol. Scand., 59, Suppl. 211, 1-106.

LAVERTY, R. and SHARMAN, D.F., 1965, Modification by drugs of the metabolism of 3-4 dihydroxyphenylethylamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in the brain.
Brit. J. Pharmacol., 24, 759.

LAVERTY, R. and SHARMAN, D.F., 1965 (a), The estimation of small quantities of 3-4-dihydroxyphenylethylamine in tissues.

Brit. J. Pharmacol. Chemother., 24, 538.

[illegible], S. and TAYLOR, K.M., 1968, The fluorimetric assay of catecholamines and related compounds : improvements and extensions to the hydroxy indol technique.
Analytical Biochem., 22, 269-279.

LIEBERMAN, L., KITT, L.D., DAVIS, J.M. and KOPIN, I.J., 1970.
The effects of haloperidol and chlorpromazine on amphetamine metabolism and amphetamine stereotype behavior in the rat
J. Pharmacol. Exp. Ther., 174, 428-433.

LOVETT, M., GIBB, J.W., DALY, J.W., LIPTON, M. and UDENFRIEND, S., 1967. A new class of tyrosine hydroxylase inhibitors and a simple assay of inhibition in vivo.
Biochem. Pharmacol. 16, 1313-1321.

LOVETT, M., SPECTOR, S., STOERDSMA, A. and UDENFRIEND, S., 1965, Elucidation of the rate limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guineapig heart.
J. Pharm. Exp. Ther., 148, 1-8.

LLINAS, A. and ROMOSO-SUAREZ, F., 1969, Connections of the substantia nigra and the ventral tegmental mesencephalic area.
In "Third Symposium on Parkinson's disease". Eds Gillingham, F.S. and Donaldson, J.M.L. Levingstone - Edinburgh. p 82-87.

LLOYD, K. and HORNYKIEWICZ, O., 1970, Parkinson's Disease : Activity of L-DOPA decarboxylase in discrete brain regions.
Science, 170, 1212-1213.

[illegible], L., 1970, The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central neuvous system of the albino rat.
Brain Res., 19, 393-418.

Mac GEER, P.L., BAGCHI, S.P. and Mac GEER, E.G., 1965, Subcellular localization of tyrosine hydroxylase in beef caudate nucleus.
Life Sci., 4, 1839.

Mac GEER, P.L., POULDING, J.E., GIBSON, W.C. and FOULKES, R.G., 1961,

Drug induced extrapyramidal reactions.
J. Amer. Med. Ass., 177, 665-670.

Mac GEER, P.L., Mac GEER, E.G., WADA, J.A. and JUNG, E., 1971, Effect of globus pallidus lesions and parkinson's disease on brain glutamic acid decarboxylase.
Brain Res., 32, 425-431.

Mac GEER, E.G., LING, G.M. and Mac GEER, P.L., 1963, Conversion of tyrosine to catecholamines by rat brain in vivo.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 13, 291.

Mac INTOSH, F.C., 1941, The distribution of acetylcholine in the peripheral and central nervous system.
J. Physiol., 99, 436.

Mac KENZIE, G.M. and SZERB, J.C., 1968, The effect of dihydroxyphenylalanine, pheniprazine and D-amphetamine on the "in vivo" release of dopamine from the caudate nucleus.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 162, 302-308.

Mc LENNAN, A., 1964, The release of acetylcholine and 3-hydroxytyramine from the caudate nucleus.
J. Physiol. (Lond.),174, 152-161.

Mc LENNAN, H. and YORK, D.H., 1967, The action of dopamine on neurones of the caudate nucleus.
J. Physiol. (London), 189, 393-402.

MAEDA, T. et DRESSE, A., 1968, Possibilités d'étude du trajet des fibres cérébrales monoaminergiques chez le rat nouveau-né.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 162, 1626-1629.

MARLEY, E., 1966, Behavioural and electrophysiological effects of catecholamines.
Pharmacological Reviews. 18, 753-768.

MARSDEN, C.A., BROCH, O.J., GULDBERG, H.C., 1972, Effect of nigral and

raphe lesions on the catechol O-methyl-transferase and monoamine oxidase activities in the rat striatum.
Eur. J. Pharmacol. 19, 35-42.

MASUOKA, D.T., SCHOTT, W.F. and PETRILLO, L.. 1968, Formation of catecholamines by various areas of cat brain.
J.Pharmacol., 139, 73-76.

MAYNERT, E.W. and KURIYAMA, K., 1964, Some observations on nerve ending particles and synaptic vesicles.
Life Science, 3, 1067-1087.

MILHAUD, G. et GLOWINSKI, J., 1962, Métabolisme de la dopamine ^{14}C dans le cerveau du rat. Etude du mode d'administration.
C.R. Acad. Science, 255, 203-205.

MITCHELL, J.F., 1963, The spontaneous and evoked release of acetylcholine from the cerebral cortex.
J. Physiol., 165, 98-116.

MONTAGU, K.A., 1957, Catechol compounds in rat tissues and in brain of different animals.
Nature, 180, p 244-245.

MOORE, R.E., 1973, Communication. III international catecholamine symposium-Frontiers in catecholamine research. Pergamon Press.

MOORE, R. Y., BHATNAGAR, R.K. and HELLER, A., 1971, Anatomical and chemical studies of a nigro-neostriatal projection in the cat.
Brain Res., 30, 119-135.

MORPURGO, C., 1962, Effects of antiparkinson drugs on a phenothiazine induced cataleptic reaction.
Arch. Int. Pharmacodyn., 137, 81-90.

MUSACCHIO, J.M., 1968, Subcellular distribution of adrenal tyrosine hydroxylase.

Biochem. Pharmacol., 17, 1470-1473.

MUSACCHIO, J.M., JULOU, L., KETY, S.S. and GLOWINSKI, J., 1969, Increase in rat brain tyrosine hydroxylase activity produced by electroconvulsive shock.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 63,1117-1119.

NAGATSU, T., LEVITT, M. and UDENFRIEND, S., 1964, Tyrosine hydroxylase : the initial step in norepinephrine biosynthesis.
J. Biol. Chem., 239, 2910.

NAGATSU, T., LEVITT, M. and UDENFRIEND, S., 1964 (a), A rapid and simple radio assay for tyrosine hydroxylase activity.
Anal. Biochem., 9, 122.

NARAHASHI, T., MOORE, J.W. and SOTT, W.R., 1964, Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons.
J. gen. Phyiol., 47, 965-974.

NEFF, N.H. and COSTA, E., 1966, Effect of tricyclic antidepressants and chlorpromazine on brain catecholamines synthesis.
In : Proceedings of the first International Symposium on antidepressant drugs (Milan), p 28-34.

NEFF, N.H. and COSTA, E., 1966(a), The influence of monoamine oxidase inhibition on catecholamine synthesis.
Life Sci., 5, 951-959.

NEFF, N.H. and COSTA, E., 1968, Application of a steady-state kinetics to the study of catecholamine turnover after monoamine oxidase inhibition or reserpine administration.
J. Pharm. Exp. Ther., 160, 40-47.

NYBACK, H., 1971, Regional disappearance of catecholamines formed from ^{14}C-tyrosine in rat brain. Effect of synthesis inhibitors and chlorpromazine.
Acta pharmacol. toxicol. 30, 372-384.

NYBACK, H., BORZECKI, Z. and SEDVALL, G., 1969, Accumulation and disappearance of catecholamines formed from tyrosine ^{14}C in mouse brain : effect of some psychotropic drugs.
European J. Pharmacol., 4, 395-403.

NYBACK, H. and SEDVALL, G., 1968, Effect of chlorpromazine on accumulation and disappearance of catecholamines formed from tyrosine ^{14}C in brain.
J. Pharm. Exp. Ther., 162, 494-501.

NYBACK, H. and SEDVALL, G., 1969, Regional accumulation of catecholamines formed from tyrosine ^{14}C in rat brain. Effect of chlorpromazine.
European J. Pharmacol., 5, 345-352.

NYBACK, H. and SEDVALL, G., 1970, Further studies on the accumulation and disappearance of catecholamines formed from tyrosine-^{14}C in mouse brain. Effect of some phenothiazine analogues.
Europ. J. Pharmacol., 10, 193-205.

NYBACK, H. and SEDVALL, G., 1971, Effect of nigral lesion on chlorpromazine induced acceleration of dopamine synthesis from ^{14}C-tyrosine.
J. Pharm. Pharmac., 23, 322-326.

O'KEEFE, R., SHARMAN, D.F. and VOGT, M., 1970, Effect of drugs used in psychoses on cerebral dopamine metabolism.
Brit. J. Pharmacol., 38, 287-304.

OKADA, Y., NITSCH-WASSLER, C., KIM, J.S., RAY, T.J. and WASSLER, R., 1971, Role of γ aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. I. Regional distribution of GABA in rabbit, rat , guinea pig and baboon CNS.
Exp. Brain Res., 13, 514-518.

OLIVIER, A., PARENT, A., SINARD, H., POIRIER, L.J., 1970. Cholinesterase striato pallidal and striato nigral efferents in the [illegible].

Brain Res., 18, 273-282.

OLSSON, R., ROOS, B.E., 1968, Concentration of 5-hydroxy-indol acetic acid and homovanillic acid in the cerebrospinal fluid after treatment with probenecid in patients with Parkinson's desease.
Nature, (London), 219, 502-503.

OLSON, L., SEIGER, A. and FUXE, K., 1972, Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation : highly fluorescent islands in developing and adult rats.
Brain Res., 44, 283-288.

PHILIPPU, A., GLOWINSKI, J. and BESSON, M.J., In vivo release of newly synthesized catecholamines from the hypothalamus by amphetamine.
(Envoyé à Archives of Pharmacology).

PIN, C., JONES, B., et JOUVET, M., 1968, Topographie des neurones monoaminergiques du tronc cérébral du chat : étude par histofluorescence.
C.R. Séances de la Soc. Biol., 162, 2136.

PLETSCHER, A. and GEY, K.F., 1969, Topographical differences in the central metabolism of DL ^{14}C 3-4 dihydroxyphenylalmine.
Experientia (Basel), 18, 512-513.

PLETSCHER, A., SHORE, P.A. and BRODIE, B.B., 1956, Serotonin as a mediator of reserpine action in brain.
J. Pharmacol, 116, 84-89.

POIRIER, L.J., 1960, Experimental and histological study of midbrain dyskinesias.
Journal of neurophysiol., 23, 534-551.

POIRIER, L.J., BEDARD, P., LANGELIER, P., LAROCHELLE, L., PARENT, A., et ROBERGE, A., 1972, Les circuits neuronaux impliqués dans la physio-pathologie des syndromes parkinsoniens.

XXIX^{ème} Réunion Neurologique Internationale. Paris. p 37-50.

POIRIER, L.J., BOUVIER, G., BEDARD, P., BOUCHER, R., LAROCHELLE, L., OLIVIER, A. and SINGH, P., 1969, Essai sur les circuits neuronaux impliqués dans le tremblement postural et l'hypokinesie.
Revue neurol., 120, 15-40.

POIRIER, L.J., Mac GEER, E.G., LAROCHELLE, L., Mc GEER, P.L., BEDARD, P. and BOUCHER, R., 1969, The effect of brain stem lesions on tyrosine and tryptophan hydroxylases in various structures of the telencephalon of the cat.
Brain Res., 14, 147-155.

POIRIER, L.J., SINGH, P., BOUCHER, R., BOUVIER, G., OLIVIER, A. and LAROCHELLE, P., 1967 (a), Effect of brain lesions on striatal monoamines in the cat.
Arch. Neurol., 17, 601-608.

POIRIER, L.J., SINGH, P., SOURKES, T.L. and BOUCHER, R., 1967 (b), Effect of amine precursors on the concentration of striatal dopamine and serotonin in cats with and without unilateral brain stem lesions.
Brain Res., 6, 654-666.

POIRIER, L.J. et SOURKES, T.L., 1965, Influence of the substantia nigra on the catecholamine content of the striatum.
Brain, 88, 181-192.

PORTIG, P.J., SHARMAN, S.F. and VOGT, M., 1968, Release by tubocurarine of dopamine and homovanillic acid from the superfused caudate nucleus.
J. Physiol., 194, 565-572.

PORTIG, P.J. and VOGT, M., 1966, Search for substances released on stimulation of the caudate nucleus in the cat.
J. Physiol. (Lond.), 186, 131p-132p.

PORTIG, P.J. and VOGT, M., 1968, Activation of a dopaminergic nigro-striatal pathway.
J. Physiol., 197, 20-21 P

PORTIG, P.J. and VOGT, M., 1969, Release into the cerebral ventricules of substances with possible transmitter function in the caudate nucleus.
J. Physiol. (Lond.), 204, 687-715.

PRECHT, W. and YOSHIDA, M., 1971, Blockade of caudate evoked inhibition of neurons in the substantia nigra by picrotoxin.
Brain Res., 32, 229-233.

RANDRUP, A. and MUNKVAD, I., 1965, Special antagonism of amphetamine abnormal behaviour.
Psychopharmacologia, 7, 416.

RANDRUP, A. and MUNKVAD, I., 1966, DOPA and other naturally occuring substances as causes of stereotypy and rage in cats.
Acta Phychiat. Scand., 42, suppl. 191, 193-199.

RANDRUP, A. and MUNKVAD, I., 1968, Behavioural stereotypes induced by pharmacological agents.
Pharmakopsychiatry. Neuro-Psychopharmacology, 1, 18.

RANSON, S.W., 1939, Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey.
Arch. Neurol. Psychiat., 41, 1-23.

RECH, R.H., 1964, Antagonism of reserpine behavioural depression by d-amphetamine.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 146, 369- 376.

RIDDELL, D. and SZERB, J.C., 1971, The release "in vivo" of dopamine synthetized from labelled precursors in the caudate nucleus of the cat.
J. Neurochem., 18, 989-1006.

RODRIGUEZ de LORES ARNAIZ, G. and DE ROBERTIS, E., 1962, Cholinergic and non-cholinergic nerve endings in the rat brain. V. Subcellular localization of monoamine oxidase and succinate dehydrogenase.
J. Neurochem., 9, 503-508.

SEDVALL, G.G., WEISE, V.K. and KOPIN, I.J., 1968, The rate of norepinephrine synthesis measured in vivo during short intervals : influence of adrenergic impulse activity.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 159, 274-282.

SCATTON, B., GARRET, C. and JULOU, L., 1973, Résultats non publiés.

SCHANBERG, S.M., SCHILDKRAUT, J.J. and KOPIN, I.J., 1967, The effects of pentobarbital on the fate of intracisternally administered ^{3}H-norepinephrine.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 157, 311-318.

SCHEEL-KRÜGER, J., 1971, Comparative studies of various amphetamine analogues demonstrating different interactions with the metabolism of the catecholamines in the brain.
Eur. J. Pharmacol., 14, 47-59.

SCHEEL-KRÜGER, J. and RANDRUP, A., 1967, Stereotype hyperactive behaviour produced by dopamine in the absence of noradrenaline.
Life Science, 6, 1389-1398.

SCHILDKRAUT, J.J., DRASKICZY, P.R. and SUNLO, P., 1971, Norepinephrine pools in rat brain : differences in turnover rates and pathways of metabolism.
Science, 172, 587-589.

SCHUMANN, H.J., 1959, Uber den hydroxytyramin gehalt der Organe.
Arch. Exp. Path. Pharmak., 236, p 474-482.

SEDVALL, G.C., WEISE, V.K. and KOPIN, I.J., 1968, The rate of norepinephrine synthesis measured "in vivo" during short intervals: influence of adrenergic nerve impulse activity.

J. Pharmacol. Exp. Therap., 159, 274-282.

SMITH, C.B., 1963, Enhancement by reserpine and α- methyl DOPA of the effects of d-amphetamine upon the locomotor activity of mice. J. Pharmacol., 142, 343-350.

SMITH, C.B. and DEWS, P.B., 1962, Antagonism of locomotor suppressant effects of reserpine in mice. Psychopharmacologia, 3, 55-59.

SNYDER, S.H. and COYLE, J.T., 1969, Regional differences in ^{3}H-norepinephrine and ^{3}H-dopamine uptake in rat brain homogenates. J. Pharmacol. Exp. Ther., 165,78-86.

SNYDER, S.H., GREEN, A.I. and HENDLEY, E.D., 1968, Kinetics of ^{3}H-norepinephrine accumulation into slices from different regions of the rat brain. J. Pharmacol. Exp. Therap., 164, 90-102.

SOURKES, T.L., and POIRIER, L.J., 1966, Neurochemical bases of tremor and other disorders of movement. The Cand. Medical Association J., 94, 53-60.

SPECTOR, S., SJOERDSMA,A. and UDENFRIEND, S., 1965, Blockade of endogenous norepinephrine synthesis by α-methyl-para-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase. J. Pharmacol., 147, 86-95.

STERN, G., 1966, The effects of lesions in the substantia nigra. Brain, 89, 449-478.

STINUS, L., LEMOAL, M. and CARDO, B., 1972, Role of newly synthesized CA in self stimulation. Physiology and Behaviour, 9, 175-182.

STOLK, J.M. and RECH, R.H., 1967, Enhanced stimulant effects of d-amphetamine on the spontaneous locomotor activity of rats treated with reserpine.

J. Pharmacol. Exp. Therap., 158, 140-149.

STOLK, J.M. and RECH, R.H., 1968, Enhanced stimulant effects of d-amphetamine in rats treated chronically with reserpine.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 163, 75-83.

SULSER, F. and DINGELL, J.V., 1968, Potentiation and blockade of the central actions of amphetamine by chlorpromazine.
Biochem. Pharmacol., 17 634-636.

SULSER, F., OWENS, M.L. and DINGELL, J.V., 1966, On the mechanism of amphetamine potentiation by desipramine.
Life Sci., 5, 2005-2010.

SULSER, F., OWENS, M., NORVICH, M. and DINGELL, J., 1968, The relative role of storage and synthesis of brain norepinephrine in the psychomotor stimulation evoked by amphetamine or by desipramine or tetrabenazine.
Psychopharmacologia (Berl.), 12, 322-332.

TAYLOR, K.M. and SNYDER, S.H., 1971, Differential effects of d- and l-amphetamine on behavior and on catecholamine disposition in dopamine and norepinephrine containing neurons of rat brain.
Brain Res., 28, 295-309.

TENNYSON, V.M., BARRETT, R.E., COHEN, G., COTE, L., HEIKKILA, R. and MYTILINEOU, C., 1972, The developing neostriatum of the rabbit : correlation of fluorescence, histochemistry, electron microscopy, endogenous dopamine levels and ^{3}H-Dopamine uptake.
Brain Res., 46, 251-285.

THER, L. and SCHRAMM, H., 1962, Apomorphin-Synergismus (Zwangsnagen bei Mausen als Test zur differenzierung psychotroper substanzen.
Arch. Int. Pharmacodyn. Terap., 138, 302-310.

THIERRY, A.M., BLANC, G. and GLOWINSKI, J., 1970, Preferential utili-

zation of newly synthetized NA in the brain stem of stressed rats.
European J. Pharmacol., 10, 139-142.

THIERRY, A.M., BLANC, G. and GLOWINSKI, J., 1971, Effect of stress on the disposition of catecholamines localized in various intraneuronal storage forms in the brain stem of the rat.
J. Neurochem., 18, 449-461.

THIERRY, A.M., JAVOY, F., GLOWINSKI, J. and KETY, S.S., 1968, Effect of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamin and serotonin in the central nervous system of the rat. I. Modification of norepinephrine turnover.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 163, 163-171.

TRANZER, J. P. and THOENEN, H., 1968, An electron microscopic study of selective acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine.
Experientia, 24, 155-156.

TRETIAKOFF, C., 1919, Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson.
Thèse. Paris.

UDENFRIEND, S., 1966, Tyrosine hydroxylase.
Pharmacol. Rev., 18, 43-51.

UDENFRIEND, S., ZALTZMAN-NIRENBERG, P. and NAGATSU, T., 1965, Inhibitors of purified beef adrenal tyrosine hydroxylase.
Biochem. Pharmacol., 14, 837-845.

UNGERSTEDT, U., 1968, 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons.
European J. Pharmacol., 5, 107-110.

UNGERSTEDT, U., 1971 (a), Striatal Dopamine release after amphetamine

or nerve degeneration revealed by rotational behavior.
Acta Physiol. Scand., Suppl. 367, 49-68

UNGERSTEDT, U., 1971 (b), Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro striatal dopamine system.
Acta Physiol. Scand., Suppl. 367, 69-93.

UNGERSTEDT, U., 1971 (c), Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro striatal dopamine system.
Acta Physiol. Scand., Suppl. 367, 95-122.

UNGERSTEDT, U., 1971 (d), Stereotaxic mapping of monoamine pathways in the rat brain.
Acta Physiol. Scand., Suppl. 367, p 1-48.

UNGERSTEDT, U. and ARBUTHNOTT, G.W., 1970, Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system.
Brain Res., 24, 485-493.

UNGERSTEDT, U., BUTCHER, L.L., BUTCHER, S.G., ANDEN, N.E. and FUXE, K., 1969, Direct chemical stimulation of dopaminergic mechanisms in the neostriatum of the rat.
Brain Res., 14, 461-471.

URETSKY, N.J. and IVERSEN, L.L., 1969, Effects of 6-hydroxydopamine on noradrenaline containing neurons in the rat brain.
Nature, 221, 557-559.

URETSKY, N.J. and IVERSEN, L.L., 1970, Effects of 6-hydroxydopamine on catecholamine containing neurons in the rat brain.
J. Neurochem., 17, 269-278.

Van ROSSUM, J.M., 1966, The significance of dopamine-receptor blocade for the mechanism of action of neuroleptic drug.
Archs. Int. Pharmacodyn. Ther., 160, 492-494.

Van ROSSUN, J.M. and HURKMANS, J.A., 1964, Mechanism of action of psychomotor stimulant drugs (significance of dopamine in locomotor stimulant action).
Int. J. Neuropharmacol., 3, 227-239.

VOGT, M., 1954, The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs.
J. Physiol., 123 p 451-481.

VON EULER, U.S. and LISHAJKO, P., 1963, Effect of adenine nucleotides on catecholamine release and uptake in isolated adrenergic nerve granules.
Acta Physiol. Scand., 59, 454-461.

VON VOIGTLANDER, P.F. and MOORE, K.E., 1971 (a), Nigro-striatal pathway : stimulation-evoked release of ^{3}H-dopamine from caudate nucleus.
Brain Res., 35, 580-583.

VON VOIGTLANDER, P.F. and MOORE, K.E., 1971 (b), The release of ^{3}H-dopamine from cat brain following electrical stimulation of the substantia nigra and caudate nucleus.
Neuropharmacol., 10, 733-741.

WALTERS, J.R., AGHAJANIAN, G.K. and ROTH, H., 1972, Dopaminergic neurons : inhibition of firing by γ hydroxybutyrate.
Fith International Congress on Pharmacology. San-Francisco. abs : 1472.

WEINER, N., 1973, Regulation of tyrosine hydroxylase in the intact adrenergic neuron during and following acute nerve stimulation.
Frontiers in Catecholamine research. III International catecholamine Symposium. Strasbourg. Pergamon Press.

WEINER, N., CLOUTIER, G., BJUR, R. and PFEFFER, R.I., 1972, Modification of norepinephrine synthesis in intact tissue by drugs

and during short term adrenergic nerve stimulation.
Pharmacol. Rev., 24, 203-221.

WEINER, W., HARRISON, W., KLAWANS, H., 1969, L-DOPA and cerebrospinal fluid homovanillic acid in parkinsonism.
Life Sci., 8, 971-976.

WEINER, N. and SELVARATNAM, I., 1968, The effect of tyramine on the synthesis of norepinephrine.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 161, 21-23.

WEISSMAN, A. and KOE, B.K., 1965, Behavioural effects of L-α-methyl tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase.
Life Sci., 4, 1037.

WEISSMAN, A., KOE, B.K. and TENEN, S.S., 1966, Antiamphetamine effects following inhibition of tyrosine hydroxylase.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 151, 339-352.

YORK, D.H., 1967, The inhibitory action of Dopamine on neurons of the caudate nucleus.
Brain Res., 5, 263-266.

YOSHIDA, M. and PRECHT, W., 1971, Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudato-nigral fibers.
Brain Res., 32, 225-228.

YOUDIM, M.B.H., COLLINS, G.G.S., SANDLER, M., BEVAN-JONES, A.B., PARE, C.M.B. and NICHOLSON, W.J., 1972, Human brain monoamine oxidase : multiple forms and selective inhibitors.
Nature, 236, 225-227.

YOUDIM, M.B.H. and SANDLER, M., 1968, Activation of monoamine oxidase and inhibition of aldehyde dehydrogenase by reserpine.
European J. Pharmacol., 4, 105-108.